

Skjedens mikroflora og bakteriell vaginose

Per Kristen Teigen, stud. med.



Prosjektoppgave ved det medisinske fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mars 2011

Innholdsfortegnelse

Abstract	4
Bakgrunn	5
Normal skjedeflora	5
Skjedens fysiologi og økosystem, etablering og normale utvikling	5
Bakteriell vaginose	6
Definisjon.....	6
Abnormal flora distinkt fra BV.....	7
Komplikasjoner.....	7
Antenatal screening	8
Diagnostikk	8
Behandling.....	9
Probiotisk og annen behandling	10
Molekylærbaserte teknikker.....	11
Taksonomi	11
Uselektiv PCR.....	11
Taxonrettet PCR	12
In situ fluorescenshybridisering (FISH).....	12
Fylomatriser	12
Skjedens mikroflora med molekylærbasert teknikk	13
Lactobacillus-dominert flora.....	13
Tabell 1.....	15
Diskusjon.....	21
BV-assosierte enkeltbakterier	27
Gardnerella vaginalis.....	27
Atopobium vaginae	28
Eggerthella, Leptotrichia, Megasphaera	28
Prevotella	28
Mobiluncus spp.	29
BV-assosierte bakterier som redskap for BV-diagnostikk og monitorering.....	29
Epidemiologi og transmissibilitet av abnormal vaginal flora	30

Epidemiologi og transmissibilitet	30
Biofilm og kohesiv <i>Gardnerella vaginalis</i>	32
Tabell 2.....	33
Diskusjon.....	34
Konklusjon og perspektiver	36
Etterord	39
Referanser	40

Abstract

Introduction

Worldwide the most common vaginal disorder, bacterial vaginosis (BV) is an exceedingly common and medically important condition in women of reproductive age. Apart from being an obnoxious disorder, with unpleasant discharge, foul odor and pruritus, which may largely impede a woman's sexual functioning and self image, BV has been linked to both gynaecological and especially obstetrical complications, e.g. chorioamnionitis and preterm delivery. BV is a clinical entity, understood as a spectrum of polymicrobial, ecological alterations in the vaginal environment, with a massive overgrowth of anaerobes in the absence of H₂O₂-producing lactobacilli, resulting in an increase in vaginal pH. Microbes play a crucial role in determining the biochemical and immunological profile of their ecological niche, which is thought to be related to the aforementioned complications. Earlier attempts to reveal individual microbial agents accounting for the pathogenesis of BV have been many, but short coming, and the etiology of the disease and the significance of the arrival and contribution of individual bacterial species in this altered polymicrobial community have remained unsettled enigmas. Several hypotheses have been put forward, from sexually transmitted pathogens to acquisition of particular *Lactobacilli* and polymorphisms of several genes involved in the innate immune system. Over the last decade the advent of and accessibility to new molecular techniques for the genotyping, identification and visualisation of new bacterial species and communities, that has hitherto been impossible with traditional culturing methods, has led to a completely new understanding of the complex microbiota of healthy and diseased vaginal flora. With fluorescence microscopy (FISH) a biofilm constituted of cohesive strains of *Gardnerella vaginalis*, frequently intermixed with the newly discovered *Atopobium vaginae*, has been described, and even found to be sexually transmitted and resistant to antibiotic therapy.

Objective

In this article a review of the comprehensive and occasionally conflicting literature of the last decade, using culture independent methods for the study of the vaginal flora, is presented, with emphasis on demographic and ethnic variation in the microbiota. The epidemiology and possible transmissibility of BV is also briefly discussed, and the significance of the *Gardnerella* biofilm for the maintenance of BV and its implications for future research on BV are considered. All articles are identified through searches in PubMed.

Conclusion

Using high throughput pyrosequencing, the current state of the art in the field of human metagenomics, new studies have thoroughly profiled the overall structure of vaginal microbial communities in different ethnic groups. Furthermore, the true taxonomic richness and diversity between individuals has been shown. The occurrence of dramatic shifts in bacterial loads in phyla and genera in association with BV has also been elaborated, and the time for quantitative PCR to supersede the microscopic diagnosis of BV has come. *Gardnerella* biofilm is probably sexually transmitted, and may well constitute the core of the pathogenesis of BV.

Bakgrunn

Normal skjedeflora

Skjedens fysiologi og økosystem, etablering og normal utvikling

Normalt sørger kvinnens skjede for opprettholdelsen av et fuktig miljø og en rik, balansert bakterieflora. Skjedeveggen består av flerlaget plateepitel uten kjertler, og skjedeseekretets hovedbestanddeler er transudat fra skjedeveggene, deskvamert epitel, cervixslim, væske fra øvre genitaltractus og leukocytter¹. Mengden skjedeseekret påvirkes svært av kvinnens hormonelle tilstand, herunder menstruasjonssyklus, svangerskap og laktasjon. Seksuell stimulering er en annen faktor som øker sekresjonen. Skjeden er et finbalansert, men dynamisk økosystem med pH på mellom 3.8 og 4.5, som er nødvendig for å opprettholde sunnhet og integritet. Det sure miljøet betraktes som et førstelinjeforsvar mot infeksjon og skyldes bakteriers nedbrytning av glykogen til bl.a. hydrogenperoksid, melkesyre og andre organiske syrer. I en studie av 14 kvinner fant Boskey et al. et forhold mellom D- og L-laktat i skjedeseekret på 55% (6-75%); disse isomerene syntetiseres av hhv. bakterier og av bakterier og skjedes epitel². Skjedeslimhinnen produserer altså også syre, og dette dogmet er derfor problematisert. Muligens er det dens fysiologi og metabolisme som hjelper frem acidotolerante *Lactobacilli*, heller enn at det er bakteriene selv som skaper det sure miljøet. Hva som er vertens og mikrobenes respektive bidrag til skjedes biokjemiske miljø er ennå ikke helt avklart, cf. Linhares et al³. Floraen domineres normalt av fakultative melkesyrebakterier, som utgjør 50-90% av den aerobe vaginale mikroflora og som vanligvis er tilstede i konsentrasjoner på 10^7 - 10^8 cfu/g i vaginal fluor⁴.

Andre syreproduserende bakterier antas også å spille inn, og endog å kunne anta en mer dominerende rolle hos tilsynelatende friske, herunder de kresne anaerobe mikrobene *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* og *Leptotrichia spp*, som har blitt påvist og beskrevet først de siste ti årene^{3,5} samt *Streptococcus* og *Enterococcus*. Muligens er det slik at disse bakteriene fyller det vakuumet som etterlates når laktobacillene av en eller annen årsak ikke greier å være den fremherskende bakteriearten⁶. Her er det variasjon mellom folkegrupper, og det kan tenkes å være relatert til immunfaktorer hos verten^{6,7}. Videre er det alltid normalt tilstede små populasjoner av kokkoide bakterier fra hud og intestinal mikroflora⁸, samt ofte påvisbare mengder av bakteriearter innen BV-spekteret: *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella spp.* og *Peptostreptococcus spp.* Prevalensen av disse andre bakteriene angis som regel å være høyere i studier med mer sensitiv molekylærbasert påvisningsteknikk, og deres relevans i normal skjedeflora er utforsket. Det synes generelt å være et inverst forhold mellom mengden av melkesyrebakterier og andre bakterier⁹, selv om det eksisterer korrelasjoner mellom hvilke spesifikke arter av *Lactobacilli* som dominerer floraen og tilstedeværelse av andre bakterier. Det er viktig å være klar over at det i skjeden hos majoriteten av friske kvinner for øvrig kan påvises relativt hyppige og signifikante, men forbigående endringer i vaginalfloraen over tid. Disse er vist å være korrelert til de samme atferdsmarkørene som utvikling av BV¹⁰. Også mikrofloraen er følsom for menstruasjonssyklus, slik at det skjer en relativ overvekst av *Lactobacillus spp.* og relativ reduksjon i

^A Disse bakteriene er imidlertid alle prediktorer for utvikling av senere abnormal flora, og det diskuteres om kvinner med overvekt av disse LA-bakteriene kan tenkes å egentlig være i en transisjonstilstand snarere enn en normaltilstand.

andre arter, slik som *Prevotella* sp. fra første til andre halvdel av syklus¹¹. Dette fenomenet er studert med molekylærbasert teknikk¹².

Ved fødselen er pikebarnets skjede steril, men da glykogeninnholdet i skjedeepitelet er høyt på grunn av østrogenstimulering fra mor, koloniseres den nyfødtes skjede raskt av melkesyrebakterier overført fra mor under fødselen^{B,13,14}. Denne første koloniseringen har vært antatt å gi opphav til det som skal bli den dominerende skjedeflora og -økologi resten av livet, selv om den blir midlertidig undertrykt av hormonendringene i prepubertalt stadium, og da kun kan påvises i små mengder. Når glykogenet forsvinner på grunn av bortfallet av østrogenstimulering, forsvinner altså grunnlaget for overlevelsen av *Lactobacilli*, og vaginalfloraen blir da mer dominert av både anaerobe og aerobe staver og kokker, *Actinomyces*, *Bacteroides*, koagulasenegative kokker, *E. coli* og andre tarmbakterier^{15,16}. Små mengder av *Lactobacillus* spp. blir imidlertid tilbake, og når østrogenproduksjonen tiltar før menarke, og vaginalslimhinnen øker i tykkelse og glykogeninnholdet stiger, vil disse bakteriene florere igjen¹⁷. Det finnes ingen studier som har tatt i bruk molekylærbaserte metoder for å avdekke skjedens mikrobiota gjennom barneår og pubertet longitudinelt, og vi har ingen kunnskap om hva som utgjør reservoaret av de ulike gruppene av melkesyrebakterier og BV-assosierte bakterier, eller hvordan de etableres i ulike folkegrupper på ulike alderstrinn.

Melkesyrebakterier har som nevnt en gunstig probiotisk funksjon ved å hemme vekst, adhesjon og spredning av andre potensielt patogene mikroorganismer. For dette er flere mekanismer beskrevet, bl.a. sekresjon av melkesyre og andre organiske syrer, samt produksjon av hydrogenperoksid og et spekter av andre antimikrobielle substanser (laktociner og biosurfaktanter)^{18,19,20}. I tillegg kommer konkurranse om næringselementene og reseptorer for adhesjon til epitelet, samt auto- og koaggregasjon^{21,22}. Det sure miljøet er av flere beskrevet både å potensere effekten av laktociner og å stabilisere hydrogenperoksid²³. Lactocinene har typisk et smalt eller bredt antimikrobielt spekter, hvor førstnevnte hemmer andre arter av *Lactobacilli*, og kan forklare hvorfor det vanligvis påvises få dominerende arter av *Lactobacilli* i samme skjedeflora, og hvor sistnevnte hemmer en rekke andre mikrober, inklusive *G. vaginalis*²⁴.

Bakteriell vaginose

Definisjon

Bakteriell vaginose er definert som en tilstand med abnormal, oftest illeluktende vaginal fluor karakterisert av (1) generelt økt bakterietetthet, med hovedsakelig massiv overvekst av anaerobe bakterier og (2) fortrenkning av især H₂O₂-produserende *Lactobacilli* med hertil økning i vaginal pH, men hvor rekkefølgen av og kausaliteten mellom disse registrerte fenomenene ikke er etablert. Konvensjonell dyrkning av BV-fluor gir et typisk spektrum av anaerobes: *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella* sp, *Peptostreptococcus* sp, *Mycoplasma hominis* og *Ureaplasma urealyticum*, samt *Mobiluncus* sp²⁵.

^B Etableringen av den nyfødtes mikrobiom og forløsningsavhengig arv fra mor er et interessant, men upløyd felt. Forskningen har primært konsentrert seg om betydningen av antibiotikaproylaks til mor. Siden det skjer en overføring fra skjeden ved vanlig fødsel, og fra hud ved keisersnitt, er det naturlig å spørre seg hva betydning denne overføringen har for senere etablering av jentas skjedeflora. Et annet ubesvart spørsmål er relevansen av overføring av inadekvate melkesyrebakterier ved abnormal skjedeflora eller BV hos mor.

Ved påvisning med molekylære teknikker ser man betydelig heterogenitet i bakteriepopulasjoner²⁶. Den totale bakteriekonsentrasjon er i de fleste tilfeller 100-1000 ganger høyere enn normalt. Ved BV er det i motsetning til vaginitt også et relativt fravær av inflammasjon i skjedeveggen.

Anslagsvis 50 % av kvinner med BV er asymptomatiske, og hovedplagene til kvinner med symptomer er plagsom utflod og lukt²⁷. Videre oppleves gjerne en symptomforverring når utfloden alkaliseres, slik som etter samleie og under menstruasjon. I andre halvdel av menstruasjonssyklus er det derimot en bedring. I motsetning til vulvovaginal candidiasis (VVC) er kunnskapen om BV, og herunder symptomer og komplikasjoner knyttet til tilstanden, beklagelig lav i befolkningen, og selvrapportert insidens er langt lavere enn prevalensen²⁸.

Abnormal flora distinkt fra BV

Bakteriell vaginose er nok en klinisk entitet innenfor et større spekter av mikrobielle skjedefloraforstyrrelser eller abnormal skjedeflora (AVF). I 2002 beskrev Donders et al. kategorien aerobisk vaginitt (AV), som både har sentrale likheter med og forskjeller fra BV²⁹. Selv om begge tilstander har et relativt fravær av laktobaciller, lav laktatkonsentrasjon og økt pH i skjeden, er mikrofloraen distinkt annerledes med overvekt av aerobe kokker og små staver (bacilli) mot det anaerobe mønsteret ved BV. Det gjelder også biokjemiske og immunologiske forskjeller, representert i tilstedeværelse av leukocytter og parabasale celler. Dette kan tenkes å gjenspeile seg i de obstetriske komplikasjonene og behandlingsresistensen som så ofte møter oss innen dette spekteret, og kan ha vært en feilkilde ved sammenblanding av distinkte mikrobielle skjedefloraforstyrrelser i tidligere studier^{30,31}.

Komplikasjoner

Anaerobe mikrober spiller en viktig rolle ved oppadstigende genital infeksjon og endometrit, og BV er i flere studier blitt assosiert til bekkeninfeksjon (PID)^{32,33,34}. Bildet er imidlertid komplisert, da kolonisering med subgrupper av BV-assosiert mikroflora heller enn BV diagnostisert ved Nugents kriterier synes å være det viktigste bindeleddet^{35,36}. Det er også vist at BV disponerer for infeksjoner postoperativt, etter keisersnitt, hysterektomi og utskrapning^{37,38}, og vel etablert at BV-behandling er effektiv forebygging^{39,40,41}. Til tross for gjensidige risikofaktorer, er BV i epidemiologiske studier funnet sterkt korrelert til tilstedeværelse av gonorré og klamydia⁴², og er funnet å øke mottakelighet både for seksuelt overførte infeksjoner (STI) generelt og HIV spesielt^{43,44}. BV antas å potensere overføringen av viruspartikler og det er gjort en rekke studier på assosiasjonen mellom BV og HIV; i metaanalyser fra 2008 og 2010 ble RR estimert til 1.6^{45,46}. Økt vertikal smitte av HIV fra mor til barn *in utero* er også studert og påvist⁴⁷.

Hos gravide er BV både assosiert til tidlige spontanaborter og infertilitet^{48,49}, og til senaborter, tidlig vannavgang (PPROM), infeksjon i fosterhinnene^{50,51}, for tidlige fødsler og lav fødselsvekt⁵², samt postpartum endometrit og neonatal sepsis^{53,54}. Stimuleringen av det medfødte immunforsvaret og en uheldig inflammatorisk profil i skjeden ved BV er antakelig et nøkkelpunkt i forståelsen av de skadelige virkningene og utfallene for svangerskapet, og har vært gjenstand for en del senere forskning, men vi er ennå i startfasen for å forstå implikasjonene av immunforsvarets og vertsfaktorerens bidrag^{8,55,56}.

Antenatal screening

Inntil videre har imidlertid studier av antenatal BV-screening og -behandling vært inkonsistente og ikke kunnet oppvise overbevisende resultater^{57,58,59}. The Cochrane Collaboration utarbeidet i 2008 en rapport, hvor screening før uke 20 for forebygging av for tidlige fødsler og lav fødselsvekt ble anbefalt⁶⁰. Kunnskapssenteret konkluderte likevel i 2010 med at det per i dag ikke er evidens for at behandling av asymptomatisk BV under svangerskap kan redusere forekomsten av de ovennevnte komplikasjoner⁶¹. Symptomatisk BV skal imidlertid behandles og er vist å redusere risiko for komplikasjoner⁶². Dette strider imot enhver intuisjon, det er ikke grunn til å tro at asymptomatisk og symptomatisk BV utgjør entiteter med ulike risikoprofiler; heller må man anta at det er tilstedeværelse av spesifikke mikrober eller vertsfaktorer⁶³, og at den manglende evidensen må tilskrives at kvaliteten på tilgjengelig forskning og effektiviteten av behandling er for lav. Særlig gjelder dette for svært tidlige fødsler, som i den generelle befolkningen er et sjeldent fenomen^{64,54}, slik at effekten i mindre kohortstudier drukner. Bildet kompliseres videre betydelig av at behandlingen for BV per i dag har uforholdsmessig lav effekt⁶⁵, både hva gjelder utrydding av de antatt patogene mikrober og gjenopprettelsen av en gunstig H₂O₂-produserende *Lactobacillus*-dominert flora. Selv om det er manglende evidens for screeningnytte i lavprevalente grupper, bør vi heller ikke avvise nytten av å identifisere risikogrupper, slik som kvinner som tidligere har født for tidlig, og forsøke å behandle dem. Vi vet som sagt heller ikke hvilke konkrete patofysiologiske mekanismer ved BV som disponerer for oppadstigende infeksjon og for tidlig fødsel. Dette kan være koblet til spesifikke mikrober og til spesifikke vertsfaktorer, som igjen meget vel kan henge sammen med behandlingssvikten. Det er all grunn til å tro at videre forskning og ny kunnskap vil kunne bidra til bedre og mer spesifikke og hensiktsmessige behandlingsregimer, med innvirkning på hvordan svangerskapsomsorgen bør innrettes for å identifisere kvinnene som har nytte av behandling. De studiene som har vist effekt, har for øvrig også vist at tidligst mulig intervensjon gir best prognose⁶⁶.

Diagnostikk

Siden etiologien bak BV ikke ennå er forstått og ettersom tilstanden ikke skrives fra en tradisjonelt definert bakteriell infeksjon med et kausalt agens, er laboratoriediagnoser for BV problematisk og heller ikke i utstrakt kommersiell bruk, verken ved isolasjon av antigen eller bakteriearvestoff eller ved serologi. Dette er imidlertid et felt i utvikling^{67,68} og vil bli diskutert senere.

Nugents kriteria anses som gullstandard for diagnostisering av BV i forskningssammenheng og bygger på summasjon av en gitt score for bakteriemorfotyper per synsfelt i gramfarget preparat for *Lactobacilli* (0-4), *Gardnerella* (0-4) og *Mobiluncus* (0-2), hvor score <4 defineres som normalflora, 4-6 som intermediær flora og >6 som BV-flora^{69,70}. En fordel med denne framgangsmåten er at preparatet fikseres og kan studeres på nytt med bl.a. mulighet for blinding av analysen. Den har også vist seg å ha god reproducerbarhet (reliabilitet) hos samme observatør og mellom observatører⁷¹.

Amsels kriteria er den mest brukte og aksepterte metode for påvisning av BV i klinisk praksis, etablert i 1983⁷². Positiv diagnose stilles ved tilstedeværelse av tre av følgende fire kriterier: (1) En karakteristisk homogen, tynn, hvitlig og klebrig utflod. (2) Utflodens pH >4.5. (3) Positiv sniff-test, i.e. en karakteristisk lukt fra frisetting av aminer og fettsyrer ved tilsetning av 10% KOH. (4) Clue-celler påvist ved mikroskopi av våtcelleutstryk, i.e. bakteriekledte epitelceller med granulær og utflytende avgrensning. Det mest sensitive kriteriet er pH-økning, og det mest spesifikke påvisning av clue-

celler. Modifiserte former er i hyppig bruk, også i forskningssammenheng, ved bl.a. sløyfing av et eller to kriterier, men uten at sensitivitet eller spesifisitet påstås å affiseres nevneverdig⁷³. Sammenlignet med Nugents kriteria oppgis metoden å ha en sensitivitet på 92%, men det er relativt stor variasjon mellom studiene⁷⁴, og vil påvirkes av i hvilke populasjoner de tas i bruk (se under).

Konkordansen mellom klinisk diagnose (Amsel) og gramfarget mikroskopisk diagnose (Nugent), slik som beskrevet over, er ikke fullstendig, og i tillegg kommer gruppen som ved Nugents kriteria defineres som intermediaær. I en studie av Navarrete et al. fant man en BV-prevalens med Amsel og Nugents kriteria (NS>6) på henholdsvis 31.1 og 31.8% blant 239 kvinner som oppsøkte en STI-klinikk for utflodssymptomer, mens sensitivitet og spesifisitet for Nugents kriteria sammenlignet med Amsel var 83 og 92%⁷⁵. I en annen større studie av Schwebke et al. ble total 617 kvinner undersøkt ved fem ulike klinikker, hvor prevalensen av BV lå mellom 27 og 63%. Samlet sensitivitet for gramfarget preparat sammenlignet med Amsel var 89%, hvis intermediaær gruppe ble inkludert, og 95% hvis ekskludert, og varierte lite fra sted til sted. Spesifisiteten, samlet målt til 84% (80% uten intermediaær gruppe), falt derimot fra 94% i den lavest prevalente populasjonen til 67% i den høyest prevalente⁷⁶. Det er opplagt at de to metodene ikke helt måler det samme. Dette hindrer en felles definisjon av diagnose og helbredelse av tilstanden og dermed sammenligning av resultatene i ulike studier⁷⁷, og er dessverre per i dag et uavklart problem.

Andre, laboratoriebaserende tester for BV inkluderer bruk av gasskromatografi og masse-/ionemobilitetsspektrometri for påvisning av metabolittene som produseres av BV-assosierte bakterier^{78,79,80}. En relativt godt kartlagt markør er den flyktige aminen trimetylamin, som for øvrig er ansvarlig for den karakteristiske fiskelukten av BV-fluor som tilsettes KOH, hvilket inngår som et Amselkriterium⁸¹. Ved å ta i bruk et utvidet spekter av flyktige og semifyktige aminer, inklusive cadaverin og putrescine, kan imidlertid sensitiviteten og spesifisiteten økes, og er blitt målt til hhv. 96% og 99% i en normalprevalent befolkning (13%)⁸⁰. En annen anvendt markør er et økt forholdstall mellom suksinat og laktat. Mens melkesyrebakteriene produserer laktat, produserer de anaerobe bakteriene som sees ved BV, økte mengder av suksinat og andre kortkjedede syrer⁸². Diagnostisk sensitivitet og spesifisitet er funnet å ligge på hhv. 54-89% og 80-96%⁷⁸. Ingen av de ovennevnte metodene er imidlertid særlig kostnadseffektive og har heller aldri vært i utstrakt bruk. Donders et al. har derimot tatt inn måling av suksinat som et mulig kriterium for å skjelne skjedefloraforstyrrelsene BV og aerob vaginitt, hvor førstnevnte vil ha høy og sistnevnte lav suksinatkonsentrasjon²⁹.

En annen indirekte metode for påvisning av BV-bakterier i skjedefloraen er måling av enzymer som er spesifikke for disse bakteriene. Aktuelle studerte markører innbefatter prolin aminopeptidase^{78,83,84}, sialidase^{78,85,86} og mucinaser⁸⁷. Hurtigtesten BVBlue® baserer seg på måling av sialidase, og er den eneste som er i utstrakt bruk kommersielt og forskningsmessig. Diagnostisk sensitivitet og spesifisitet er svært god, hhv. 88-100% og 91-100%, og validert i flere studier^{88,89,90,91}. Denne testen må anses som et fullgodt alternativ i sammenhenger hvor det ikke ligger til rette for mikroskopering av utfloden.

Behandling

BV behandles i henhold til de fleste retningslinjer med metronidazol eller klindamycin per os eller *per vaginam* i alt fra éndose til syvdagersregimer⁹². De to antibiotikaene og administrasjonsfor-

mene er bedre enn placebo, og opp mot hverandre viser de alle like god behandlingseffekt. Éndose anbefales imidlertid ikke lenger, da det har vist dårligere resultater⁹³. Et forholdsvis nytt alternativ er tinidazole, som gis som éndose, og som har vist minst like god effekt som de i lengre tid etablerte behandlingene⁹⁴. Larsson og Forsum konkluderte i sin oversikt fra 2005 med at forventet behandlingseffekt ikke overstiger 60-70%, og at langtidsoppfølgingsstudier gir en samlet varig helbredelse på omkring halvparten. Senere studier har imidlertid påpekt at disse estimatene er noe optimistiske, da kvinnene generelt ikke har vært fulgt lenge nok, og kriteriene for effekt ikke har vært strenge nok. Et kjennemerke for studier på BV-behandling har vært en oppsiktsvekkende inkonsistens med henblikk på definisjon av diagnose og helbredelse av sykdommen, og FDA (the US Federal Drug Administration) har fremmet retningslinjer for hvordan effektstudier av BV-behandling skal gjennomføres. I henhold til disse retningslinjene skal tilbakegang av tilstanden verifiseres med Amsels kriteria i kombinasjon med Nugent score <3. Nyere studier som har fulgt disse strenge kriteriene har gitt behandlingseffekter på omkring en tredel⁹⁵.

I en toneangivende studie av Sobel et al. ble 112 kvinner med tilbakevendende BV randomisert til vedvarende suppressiv metronidazolprofylakse eller placebo⁹⁶. De hadde oppnådd initial respons etter 10 dagers intravaginal metronidazolbehandling, definert som ≤ 2 Amsels kriteria (utgjorde 88% av den opprinnelige gruppen). Etter 16 uker hadde 65% i metronidazolgruppen NS<7 mot 47% i placebo-gruppen, og etter 28 uker var tallene 50% mot 29% (ikke lenger statistisk signifikant forskjell). Det er rimelig å anta at det er en midlertidig undertrykking av patogene bakterier, som utvikler antibiotikaresistens og blusser opp igjen, heller enn at det finner sted en ny infeksjon, og behandlingseffekt må åpenbart måles på en annen måte og over lengre tid.

Risikofaktorer for tilbakefall etter behandling har blitt studert i en grundig kohortestudie av Bradshaw et al. som fulgte 130 kvinner i Australia over et år⁹⁷. Hele 58% fikk tilbakefall av BV (NS>6) og 69% forstyrret vaginalflora (NS>3). Statistisk signifikante risikofaktorer assosiert til tilbakefall av BV var tidligere BV-episode (RR=2), sex med kvinner (RR=2.9) og *fast* partner gjennom studien (RR=2.3). Hormonell prevensjon var for øvrig protektivt (RR=0.4). Faktorene assosiert til debut og tilbakefall av BV er altså ikke helt de samme, hvilket styrker hypotesen om et potensielt mannlig reservoar og seksuell transmisjon av bakterier (se under). For en BV-negativ er det risiko for BV ved partnerskifte, men for en BV-positiv er det økt mulighet for å bli frisk ved partnerskifte.

Probiotisk og annen behandling

Det er opplagt at kunnskapen om normal skjedeflora kan bidra til strategier for å bevare gunstige og helsefremmende arter og underarter av *Lactobacilli* i skjeden. Selv om det er et utmerket rasjonale for probiotisk terapi, gjenstår det ennå å se om applikasjon av slike *Lactobacilli*, eventuelt i kombinasjon med antibiotika eller annen behandling, som østrogen⁹⁸ eller surgjøring av skjeden⁹⁹, kan være tilstrekkelig for gjenopprette og bevare sunn skjedemikroflora. De kommersielt tilgjengelige probiotika har tradisjonelt vært framstilt i matvare- og meieriindustri, selv om humane *L. gasseri* og *L. rhamnosus* (EcoVag®) har blitt tilgjengelig i senere tid. 17 randomiserte placebokontrollerte studier er gjennomført, oppsummert i en systematisk oversikt av Senok et al. i 2009¹⁰⁰. De konkluderte med at det ikke fantes evidens for at probiotisk terapi verken alene eller i kombinasjon med antibiotika er bedre enn antibiotika alene i behandling av BV, men at det er nødvendig med større velorganiserte studier for å avklare dette spørsmålet.

Molekylærbaserte teknikker

Dyrkningsbaserte teknikker baserer seg på bakterievekst på selektive medier i laboratoriet. I noen tilfeller kan de utvise formidabel sensitivitet og påvise enkeltbakterier i store vevsvolum. Dyrkning er en rimelig og tilgjengelig metode, som ikke stiller store krav til tekniske ferdigheter, og som gir mulighet for å studere bakteriens antibiotikaresistens, virulensfaktorer og metabolisme. Det er imidlertid bare de mikrobene som har evne til uavhengig vekst på de utvalgte mediene som lar seg dyrke, og en stor andel av mikrobene i den studerte økologiske nisjen vil derfor neglisjeres. Med tanke på de mange kresne og anaerobe mikroorganismene som påvises i skjeden og kobles til BV, og deres komplekse metabolske behov, har molekylærbaserte teknikker vist seg spesielt relevant for studiene av skjedens mikrobiologi. Fordelen med disse teknikkene er muligheten for å klassifisere de ulike artene på bakgrunn av deres genom, hvilket i teorien muliggjør påvisning og kvantitering av enhver bakterie, så lenge testen er sensitiv nok til å fange den opp.¹⁰¹

Taksonomi

Et taxon er en kategori eller et klassifikasjonsnivå for levende organismer, og rangeres hierarkisk i bl.a. rike, rekke (*phylum*), klasse, orden, familie, slekt (*genus*) og art (*species*). Fylogenetisk klassifisering tar sikte på å rekonstruere organismenes slektskapsforhold, og fordeler organismer i grener som reflekterer genetisk likhet og dermed slektskap i evolusjonært perspektiv. Artene utgjør basisenheten i det taksonomiske systemet. Men i mange molekylærbaserte studier anvendes ulike begreper slik som taxa, operasjonelle taksonomiske enheter (OTUs) og fylotyper istedenfor arter, ettersom de molekylære variasjonene er så mangslungne at de langt overgår dimensjonene av eksisterende mikrobiologiske eller biokjemiske metoder for inndeling. Artsinndelingen defineres gjerne i henhold til % sekvenslikhet mot referansesekvenser¹⁰².

Uselektiv PCR

Ved å ta i bruk primere som binder seg til de svært konservative regionene på bakteriers 16S rRNA gen, kan man kopiere opp PCR-produkter fra de aller fleste bakteriearter. Siden disse amplifikasjonsproduktene typisk vil inneholde variable, taxonspesifikke sekvenser (V-domener), vil de forskjellige bakteriene gi forskjellige PCR-produkter, som ved ulike metoder så kan sorteres og brukes til å identifisere individuelle taxa. Viktige eksempler er 1) Denatureringsgradient-gelelektroforese (DGGE), som utnytter PCR-produktenes individuelle mobilitetsprofil i gelen, slik at man kun må avlese noen få av dem. 2) Terminalt restriksjonsfragment-lengdepolymerase (T-RFLP) hvor lengden på fluorescensmerkede, avklippede endestykker fra de amplifiserte PCR-produktene blir bestemt¹⁰³. 3) Kloning, hvor PCR-produktene limes inn i et plasmid som overføres til en bakterie, som siden dyrkes. Deretter tar man ut og sekvenserer et visst antall klonplasmider, som nå utgjør et genbibliotek. 4) Pyrosekvensering, hvor en kjemisk lysproduserende enzymatisk reaksjon utløses hver gang et nukleotid binder til den komplementære tråden, slik at man kan lese av den aktuelle DNA-sekvensen.¹⁰¹

Etter å ha bestemt sekvensen av amplifiserte PCR-produkter i prøven, sammenholdes disse med tidligere kjente sekvenser i GenBank eller RDP (Ribosomal Database Project) ved hjelp av et dataprogram, BLAST eller liknende, og det søkes etter homologi. Ved en delvis treff, kan denne sekvensen bli plassert et nivå opp i det fylogenetiske treet, f.eks. innen en angitt genus eller phylum¹⁰⁴.

Taxonrettet PCR

Denne metoden tar i bruk primere designet for en på forhånd kjent DNA-sekvens. Disse kan være artsspesifikke eller inkludere f.eks. alle artene innen en slekt. Med taxonrettet PCR økes sensitiviteten dermed betraktelig og man kan påvise bakteriepopulasjoner som er i stort undertall. Ved hjelp av sanntids PCR med fluorescensmerking kan man også kvantifisere de studerte bakteriene, etter mengden fluorescens i hver syklus (qPCR)¹⁰⁵. De bakterieartene man ikke leter spesifikt etter, lar seg imidlertid ikke påvise med denne metoden.

Fordelen med uselektiv PCR fremfor taxonrettet PCR er muligheten for påvisning av mikrober uten en a priori hypotese vedrørende sammensetningen av bakterier i prøven. Bakteriearter som er i stort undertall kan imidlertid lett overses, og det er heller ikke alle bakteriearter som fester til de universelle primerne som brukes. Videre kan amplifikasjonen skje med forskjellig effektivitet. Dette kan gi omfattende systematisk bias, uselektiv PCR kan således både overse hele slekter av bakterier eller de kan fremstå som i relativt undertall. Et eksempel er fravær og underestimering av *G. vaginalis* hos kvinner med BV i studier som har brukt primeren 27f¹⁰⁶. Det er meget viktig å være klar over denne essensielle, men dessverre underrapporterte fallgruben og kilden til systematisk bias når vi vurderer mikrobiologiske studier med bruk av uselektiv PCR. Vi er på vei til å oppnå dypere forståelse av menneskets mikrobiom enn noen gang, men i denne prosessen må vi regne med at mye av det vi ser kan være relativt snevre dypdykk ned i det som er et langt større og komplekst mikrobiologisk mangfold. Sammenlikning av studier som bruker ulike ekstraksjonsmetoder og ulike primere og fremgangsmåter for behandling av DNAet, er notorisk vanskelig, men de komplementerer hverandre og kan samlet gi et mer fullstendig bilde^{101,106}.

Det er ikke uvanlig å utvide sensitiviteten ved å bruke forskjellige primersett, eller utfylle uselektiv med taxonrettet PCR for å få riktigere bilde. Muligheten for å hemme oppkopiering av dominerende species og dermed øke bindingen til og avlesningen av arter med lavere sensitivitet for prosedyren er også en mulighet, men ikke mye brukt. Ofte baserer de valgte fremgangsmåtene seg på erfaringer etter små forutgående pilotstudier, og det er vanskelig å vurdere hensiktsmessigheten i dem¹⁰⁷.

In situ fluorescenshybridisering (FISH)

Med fluorescensmerkede oligonukleotidprober kan bakterier som er fiksert i vev og kroppsvæsker visualiseres gjennom mikroskopi med tanke på morfologi og lokalisering. FISH kan også komplementeres av den uselektive PCR-kvantifiseringen, fordi disse gensekvensene kan brukes til å designe nye FISH-prober¹⁰¹.

Fylomatriser

En fylomatrise kan utrustes med flere tusen komplementære 16s rRNA gensekvenser for spesifikke bakteriearter, som farges med fluorescens og scannes. Dette muliggjør påvisning av tusener av taxa i samme prøve og er lettvinnt og kostnadseffektivt. Men fylomatrisene kan ikke brukes til å identifisere nye arter og har langt lavere sensitivitet enn taxonrettet qPCR.

Skjedens mikroflora med molekylærbasert teknikk

Lactobacillus-dominert flora

Vaginalfloraen ble første gang beskrevet av den tyske mikrobiologen Albert Döderlein i 1892, som ubevegelige staver som fremkom i lysmikroskopiske preparater hos friske kvinner¹⁰⁸, herav det eponymisk deriverte navnet Döderlein bacilli/flora. I 1928 ble disse stavene tolket og merket taksonomisk av Stanley Thomas som *L. acidophilus*¹⁰⁹. *L. acidophilus* ble imidlertid med DNA-studier vist å utgjøre et heterogent spekter, og er nå delt i to homologe grupper, de homofermentative A og heterofermentative B med henholdsvis fire og to arter i hver gruppe¹¹⁰. Disse nært beslektede artene lar seg vanskelig differensiere med fenotypiske metoder, hvilket kan forklare variasjonen og inkonsistensen i arter i tidlige studier¹⁰². I 1987 reviderte Giorgi et al. bildet, og beskrev med genotypiske metoder dominansen av *L. crispatus*, *L. gasseri* og *L. jensenii*, samt flere til da uidentifiserte arter¹¹¹. De fenotypiske metodene for identifisering av *Lactobacillus spp* har beklageligvis svært dårlig overensstemmelse med genombaserte tester, og eldre studier som har etterstrebet fininndeling av skjedens mikrobiologi har derfor liten relevans i dag¹¹².

I 1999 ble for første gang *L. iners* isolert. Den sene påvisningen skyldtes at *L. iners* kun vokser på blodagar¹¹³, men denne bakterien har fått en sentral rolle i senere forskning på skjedens mikrobiologi, ettersom den er en av de vanligst forekommende *Lactobacillus spp* hos kvinner både med og uten BV¹¹⁴. Dette i motsetning til øvrige *Lactobacillus spp* som fortrinnsvis påvises hos de uten BV^{115,116,117}. På grunn av *L. iners'* kresenhet med tanke på dyrkning er dens antagonistiske evner overfor andre bakterier ikke godt studert og kjent¹¹⁸. De eneste som har vurdert dens H₂O₂-produksjon er Antonio et al. i to studier^{119,120}, som har vist at den produserer små mengder H₂O₂. Det er postulert at *L. iners* er bedre tilpasset et BV-dominert miljø, og at den er resistent mot ukjente faktorer som fører til fortrenkning av øvrige *Lactobacillus spp* ved BV, eller eventuelt at det er et relativt fravær av antagonisme mellom *L. iners* og BV-assosierte anaerober¹²¹.

Med molekylærbasert teknikk er det nå påvist vel 20 arter av *Lactobacillus spp* i skjeden, og det er vist at vaginalfloraen hos majoriteten er dominert av en eller to arter fra et sett på tre til fire hovedgrupper av homofermentative *Lactobacillus spp*, nemlig *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii* og *L. gasseri*. Andre arter er sjeldnere og lavere i titer¹⁰². Disse inkluderer *L. johnsonii* og *L. vaginalis*, samt de heterofermentative *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. pentosus*, *L. plantarum* med flere. Studier er utført i en rekke forskjellige land (Sverige, Belgia, Bulgaria, Tyrkia, UK, Nigeria, Sør-Afrika, Kina, Japan, India, Brasil, USA og Canada), og disse har vurdert variasjonen av påvisbare *Lactobacilli* hos friske vs. BV+, VVC+ og HIV+, samt hos ungdommer og postmenopausale kvinner (tabell 1) og i risikogrupper for utvikling av BV. Det er betydelig individuell variasjon, men óg signifikante forskjeller mellom folkegrupper i hvilke arter som dominerer. Et gjennomgående funn er en relativ reduksjon i forekomsten av *L. crispatus*, særlig underarter som har høy antagonisme overfor andre bakterier og evne til H₂O₂-produksjon, og en relativ tilstedeværelse av et taksonomisk artsmangfold ved høy pH og Nugent score (asymptomatisk intermedier og bakteriell vaginose). Hvorvidt disse kvinnene egentlig har en mindre funksjonell flora, er imidlertid ikke fastsatt (se under).

Selv om alle naturlig forekommende *Lactobacillus spp* oppviser en beskyttende rolle overfor andre bakterier, utviser de ulik protektivitet i så henseende. Dette er generelt antatt å skyldes varierende evne til H₂O₂- og bacteriocin-produksjon, og oppmerksomheten har spesielt vært rettet mot H₂O₂-produserende *Lactobacilli* (LB⁺). Disse er påvist å være langt mer effektive enn de øvrige (LB⁻) i å undertrykke BV-assosierte bakterier både in vitro og in vivo²⁵, med tydelig klinisk relevans vist i longitudinelle studier^{122,123,124}. Hydrogenperoksid utsetter altså de andre bakteriene for et konstant oksidativt stress, og spesielt under samtidig tilstedeværelse av myeloperoksidase (MPO), som finnes i høye konsentrasjoner i vaginalfluor¹²⁵. Med molekylærbaserte teknikker, er det mulig å relatere H₂O₂-produksjonen til individuelle arter eller underarter, og tre studier har sett på laktobacillenes H₂O₂-produksjonen med molekylærbaserte teknikker^{119,126,127}. Wilks et al. fant et statistisk signifikant, inverst forhold mellom laktobacillenes H₂O₂-produksjon og risiko for chorioamnionitt (RR=3) og for tidlig fødsel (RR=2). Risikoen for de samme komplikasjonene var også økt hos de kvinnene som ikke hadde påvisbare *Lactobacilli* generelt i skjeden (RR=2)^c. Song et al. fant at *Ll. crispatus*, *vaginalis*, *gasseri* og *fermentum* var de vanligst forekommende artene (alle isolert hos >5%) blant japanske gravide kvinner, og underarter av *L. fermentum* var de eneste H₂O₂-negative. Utvalget av BV-positive var for lite til å konkludere (n=6), men alle de nevnte *Lactobacillus spp* ble like fullt påvist i denne gruppen. Antonio et al. viste derimot at de *Lactobacillus spp* som produserte lite H₂O₂ (*L. gasseri* og *L. iners*) hadde fire til fem ganger høyere forekomst av BV (22/58) enn de som var kolonisert med *Lactobacillus spp* som produserte mye H₂O₂ (*Ll. crispatus* og *L. jensenii* (14/165).

Vi må anta at tilstedeværelse av *Lactobacilli* utgjør bærebjelken i skjedsens intrinsiske forsvar mot patogene mikrober og er en markør for normal, sunn skjedeflora. Dette har naturlig nok vekket interessen for vurdering og oppfølging gjennom direkte mikroskopering, siden *Lactobacilli* er enkle å påvise i våtutstryk og grampreparat. *Lactobacilli* klassifiseres i våtutstryk i fire typer etter Donders (rev. etter Schröder)¹²⁸, hvor LBGIIb og LBGIII er korrelert til patologiske tilstander¹²⁹. I en stor kohortestudie av Hay et al. ble 1958 kvinner fulgt, og fravær av beskyttende *Lactobacilli* ble vist å være sterkt assosiert til prematur fødsel, tydeligere enn tilstedeværelse av full bakteriell vaginose^{53,130}. *Lactobacilli* kan nå vurderes svært presist i grampreparater, og den første inndeling av lactobacillemorfotyper etter Ison&Hay (grad I-III), er utviklet videre, etter Claey's, med inndeling av grad I i grad Ia, lab og Ib¹³¹, hvor Ia gir overvekt av *L. crispatus*, lab av *L. crispatus* samt andre *Lactobacilli* og Ib overvekt av andre *Lactobacillus*-morfotyper enn *L. crispatus*. Verstraelen et al. fulgte 100 gravide kvinner med penselprøver til gramfarging, og mikroskopering i henhold til Claey's kriterier ble utført i hvert trimester. Sammenliknet med grad Ia og lab hadde kvinner med grad Ib (konstellasjonen *Ll. gasseri/iners*) ti ganger så høy risiko for å utvikle abnormal skjedeflora. Tilstedeværelsen av spesifikke *Lactobacillus spp* er derfor tenkt å være bestemmende for skjedsens mikroflora under svangerskap, hvor *L. crispatus* fremmer stabilitet og *L. gasseri* disponerer for utvikling av abnormal flora. Samlet for alle folkegrupper og skjedefloraer er *L. iners* den vanligste *Lactobacillus sp*. Av ukjente årsaker påvises også *L. iners* relativt oftere i høye konsentrasjoner hos kvinner med en ellers forstyrret flora. Den er også den raskeste til å rekolonisere skjeden etter behandling med metronidazol¹³².

^c De har imidlertid ikke vurdert *L. iners*, ettersom MRS agar ble brukt under innledende dyrkning. *L. iners* er en av de hyppigst forekommende laktobacillene, og er senere vist å produsere relativt lave mengder H₂O₂.

Tabell 1.

Sammenfatning av molekylærbaserte studier på skjedens mikrobiota i ulike befolkningsgrupper

Studie ^D	År	Populasjon	Metode	Hovedfunn
†1. Antonio, Hawes, Hillier ¹¹⁹	1999	USA Tverrsnittsstudie 302 kvinner rekruttert fra STI-klinikker BV definert som NS>6	Dyrkning på Rogosa og blodagar Taxonrettet PCR og DNA-DNA hybridisering Peroxid test	71% av kvinnene hadde påvisbare Lactobacilli. Av de 29% uten, hadde 84% BV. 8% var kolonisert av >1 <i>Lactobacillus</i> sp. <i>L. crisp.</i> hos 32% (9% av disse BV). <i>L. jens.</i> 23% (7% BV) <i>L. iners</i> 15% (36% BV) <i>L. gass.</i> 5% (43% BV). Andre isolerte <i>Lactobacilli</i> lå under 1%. <i>L. crisp</i> og <i>L. jens</i> hhv 95% og 94% H ₂ O ₂ -produksjon, <i>L. gass.</i> 7% og <i>L. iners</i> 9%.
2. Song et al. ¹²⁷	1999	Japan Tverrsnittsstudie Avføringsprøve fra 49 mødre, 36 nyfødte Skjedefrøve fra 27 mødre, 64 gravide og 6 BV-positive	Dyrkning på MRS agar DNA-DNA hybridisering med 26 L. sp.-referanser Peroxid test	Avføringsprøvene viste med fallende prevalens <i>L. crisp.</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. gass.</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> og <i>L. salivarius</i> , med god samvariasjon mellom mor og nyfødt barn. Skjedefrøvene viste <i>L. crisp.</i> <i>L. gass.</i> , <i>L. vag.</i> og <i>L. ferment.</i> og andre 5%. <i>L. crisp.</i> var den sterkeste H ₂ O ₂ -prod, fulgt av <i>L. gass.</i> og <i>L. vag.</i> <i>L. fermentum</i> var en svak H ₂ O ₂ -produsent, og de øvrige H ₂ O ₂ -negative.
†3. J Burton, G Reid ¹¹⁶	2002	Canada Kohortestudie 20 asymptomatiske postMP uten HRT 4 månedlige kontroller Diagnostikk etter Nugent	Uselektiv PCR HDA1-GC og HDA2 Taxonrettet PCR DGGE	70% BV eller IM ved start. 20% N gjennom hele studien. Lactobacilli ble påvist hos 95%, skjønt ofte med svakt produkt. Kvinner med høy NS oppviste bånd representerende <i>G. vaginalis</i> , <i>Prevotella</i> spp, <i>Peptostrept.</i> og <i>Bacteroides</i> . Forfatterne konkluderer med at Nugents kriteria ikke er adekvat for vurdering av vaginal flora hos postMP.
†4. Pavlova et al. ¹³³	2002	Argentina, Brasil, Kina, India, Sør-Korea, Tyrkia og USA Tverrsnittsstudie 200 isolater fra preMP Et mor-datter-par	Dyrkning på Rogosa og MRS. Fenotyping etter fermentering. Uselektiv PCR av 16S rRNA med tre primersett.	Første studie med uselektiv PCR av 16S rRNA. Fylogenetisk analyse. 71% av isolatene innen de homofermentative hovedgruppene <i>L. crisp.</i> , <i>L. jens.</i> og <i>L. gass.</i> 23% <i>L. fermentum</i> , <i>L. vaginalis</i> , <i>L. rhamnosus</i> og <i>L. paracasei</i> . Mor og datter kolonisert med hhv <i>L. crisp.</i> og <i>L. jens.</i>
5. Silvester et al. ¹³⁴	2002	Sør-Afrika In vitro studie av 57 LAB isolert fra 259 kvinner på pre- og post-natal klinikk	Dyrkning på MRS agar. Biokjemiske tester, proteinisolat og gelelektroforese.	Heterofermentative <i>Lactobacilli</i> ble undersøkt. <i>L. pentosus</i> hyppigste fakultativt heterofermentative. <i>L. fermentum</i> den hyppigste obligat heterofermentative, samt <i>W. viridiscens</i> . De fant også høy forekomst av enterokokker, <i>E. faecium</i> og <i>E. faecalis</i> . Dendrogram for slektskapene.
6. Tärnberg et al. ¹³⁵	2002	Sverige Tverrsnittsstudie 23 friske preMP kvinner Nugent <4	Dyrkning på Rogosa og blodagar 402 tilfeldige kolonier analysert. Uselektiv PCR av 16S rRNA, V1 og V3 Pyrosekvensering	Første studie hvor pyrosekvensering er brukt. 74% kolonisert av en L. sp., 17% av to L. spp. Fire hovedgrupper, <i>L. crisp.</i> (39%), <i>L. jens.</i> (39%), <i>L. gass.</i> (30%) <i>L. iners</i> (17%). <i>L. vaginalis</i> isolert fra en kvinne (4%). Pyrosekvensering er en rask og pålitelig metode, men for subtyping må lengre

^D Sentrale studier er merket med crux †.

	av 20-40 bp		sekvenser avleses.	
7. Vásquez et al. ¹³⁶	2002	Sverige Tverrsnittsstudie 202 isolater fra 23 friske preMP kvinner, Nugent<4, typet og identifisert	Dyrkning på MRS og blodagar. RAPD, TTGE med typing mot referanser. Taxonrettet PCR.	Første studie med bruk av RAPD på skjedefloraen. De fleste hadde homogen flora 82% en RAPD-type, 18% to. Konkordans mellom RAPD-TTGE og taxonrettet PCR. Kun <i>L. crisp.</i> ble påvist med uselektiv PCR. <i>L. crisp.</i> 46%, <i>L. gass.</i> 25%, <i>L. iners</i> 14% <i>L. jens.</i> 14%.
†8. Burton et al. ¹³⁷	2003	Canada Longitudinell studie 19 preMP Skjedefrøve d0 og m6 10 mottok probiotika Skjedefrøve d0, d3, d7, d14 og d21. En av dem frafalt fra studien.	Dyrkning og RAPD Taxonrettet PCR DGGE	42% kolonisert med <i>L. iners</i> ved start. 37% <i>L. crisp.</i> 5% <i>L. gass.</i> Seks (32%) hadde <i>G. vaginalis</i> ved start. Tre av dem i dominant antall og flora tilsvarende asymptomatisk BV etter Nugent. 50% hadde ingen umiddelbar endring i DGGE-profil etter tilført probiotika. De eksogent tilførte laktobacillene forsvant gradvis fram mot d21. Etter 6 måneder hadde 56% av de 18 en annen DGGE-profil enn ved start. Forfatterne opplyser ikke hvilke endringer som ses.
†9. Devillard, Burton, Hammond, Lam, Reid. ¹³⁸	2004	Canada Kohortestudie 19 postMP på HRT 4 månedlige skjedefrøver	Uselektiv PCR HDA1-GC og HDA2 Taxonrettet PCR DGGE DNA-DNA hybridisering for <i>C. albicans</i>	Etter Nugents kriterier var 68% normale og 32% IM eller BV ved start. Tallene uten HRT var hhv. 20% og 80% ¹¹⁶ . Kvinnene oppviste ikke-komplekse floraer, med kun noen få DGGE-bånd per prøve. <i>Lactobacilli</i> påvist hos alle, fremst <i>L. iners</i> (47%) og <i>L. crisp</i> (41%). 40% forble normale, 10% vekslet mellom BV og I, og 50% vekslet mellom N, I og BV. 26% påvist <i>C. albicans</i> .
†10. Verhelst, Verstraelen, Claeys et al. ¹⁰⁷	2004	Belgia Tverrsnittsstudie 115 gravide, 35 ikke-gravide preMP 8 av prøvene nærmere studert Diagnostikk etter Ison&Hay	Taxonrettet PCR for <i>A. vaginae</i> og <i>G. vaginalis</i> (n=150) Uselektiv PCR 10F og 534R Kloning og ARDRA (n=8) Sekvensering av ~200 kloner	Foregangsstudie for kloning. De tre med grad I flora dominert av <i>L. crisp.</i> og/eller <i>L. gass</i> (85-99%). Hos de med grad II og III ble kun <i>L. iners</i> påvist (0-84%). <i>A. vaginae</i> hos 4 av 5 med grad II og III flora (2-80%), sameksisterende med <i>G. vag.</i> , <i>Peptostrept.</i> , <i>Prevotella</i> og <i>Leptotrichia</i> i varierende titere. Slående koeksistens av <i>A. vag.</i> og <i>G. vag.</i> ved grad III, diagnostisk sensit. 78%, spes. 98%. Stor variasjon i påvisningsgrad ved bruk av ulike taxonspesifikke primersett, og forfatterne tar til orde for at ulike primersett bør tas i bruk for komplementering.
†11. Wilks et al. ¹²⁶	2004	UK Tverrsnittsstudie 73 gravide, tidligere for tidlig fødsel BV etter Amsel Histologi av placenta	Prøve tatt uke 20 Dyrkning på MRS agar. Uselektiv PCR Z1-F og Z2-R Peroxid test	16% ingen <i>Lactobacilli</i> . 45% en dominerende <i>L. sp.</i> og 36% to <i>LL. spp.</i> Samlet utgjorde <i>L. gass.</i> 29%, <i>L. crisp.</i> 23%, <i>L. vaginalis</i> 17% og <i>L. jens.</i> 16%. <i>L. vaginalis</i> og <i>L. jens.</i> oppviste høyest H ₂ O ₂ -produksjon, <i>L. crisp.</i> noe lavere og <i>L. gass.</i> lavest. Lav H ₂ O ₂ -prod. kraftig assosiert til BV (p=.0007) og chorioamnionitt og/eller tidlig fødsel (p=.028)
12. Zhou et al. ⁵	2004	USA Pilotstudie, tverrsnitt 5 preMP	Uselektiv PCR av 16S rRNA 8F og 926R	Tre kvinner dominert av <i>L. crispatus</i> og <i>L. iners</i> , de andre to av <i>Atopobium vaginae</i> og av <i>A. vaginae</i> , <i>Leptotrichia</i> og <i>Megasphaera</i> .

	selvrapportert friske	Kloning, avlesning fra ~200 kloner	
13. Coolen et al. ¹³⁹	2005 USA Longitudinell studie gjennom menstruasjonssyklus, dag 2, 5, 20 og 24 5 selvrapportert friske	Uselektiv PCR av 16S rRNA, 8F og 926R 341F og 1406R T-RFLP	Foregangsstudie for bruk av T-RFLP i studier av skjedens mikrobiologi. Fatterne vurderer T-RFLP som et egnet verktøy. De fant individuelle, <i>stabile</i> normalpopulasjoner. Fire kvinner dominert av <i>L. crispatus</i> og <i>iners</i> , en av <i>Atopobium</i> .
14. Fredricks et al. ¹¹⁵	2005 USA Tverrsnittsstudie og longitudinell studie 9 BV ⁺ og 8 N (Amsel) preMP, lesbiske eller besøkende STI-klinikk - 4 BV ⁺ avga gjentatte oppfølgingsprøver	Taxonrettet PCR Uselektiv PCR av 16S rRNA 338F og 1407R Kloning	Friske kvinner hadde gjennomsnittlig 3.3 fylotyper, mens BV ⁺ 12.6. Tre unike nye arter ble påvist utelukkende hos BV ⁺ , BVAB 1, 2 og 3, med slektskap til <i>Gardnerella vaginalis</i> og <i>Clostridium</i> . Forfatterne demonstrerte potensialet for PCR-diagnostikk av BV, med sensitivitet 100% og spesifisitet 91% ved deteksjon av BVAB2 eller <i>Megasphaera</i> . Effektiv behandling med skifte fra BV- mønster til <i>L. crisp.</i> -dominert flora (99%) ble vist hos en kvinne.
15. Hill et al. ¹⁴⁰	2005 Canada Tverrsnittsstudie 23 friske preMP Nugent<4	Uselektiv PCR av chaperonin-60 H279 og H280 Kloning og sekvensering av ~400 kloner per genbibliotek	Første studie med PCR på chpn-60. Kvinnene var kolonisert av 1-17 forskjellige arter, hvorav 20% kun av én art, og 40% utelukkende av <i>Lactobacilli</i> . Vanligst <i>L. crisp.</i> og <i>L. iners</i> , men og <i>L. gass.</i> og <i>L. jens.</i> i lavere titere. Andre sentrale kloner var <i>G. vaginalis</i> og <i>Megasphaera</i> . Stor intraspecies variasjon.
†16. Hyman et al. ¹⁴¹	2005 USA Tverrsnittsstudie 20 friske preMP Ikke undersøkt utover klinisk inspeksjon	Uselektiv PCR av 16S rRNA 5F og 1492R Kloning ~2000 avlesninger per individ, ekskl. produkter <900bp	Toneangivende studie for uselektiv PCR. 20% hadde så godt som kun en <i>Lactobacillus</i> sp., 45% blandet <i>Lactobacillus</i> -dominert flora, med tilstedeværelse av særlig <i>Bifidobacterium</i> , <i>G. vaginalis</i> , <i>A. vaginae</i> og <i>Corynebacterium</i> . 35% nesten ingen <i>Lactobacilli</i> , og dominert av <i>Bifidobacteriales</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Streptococcus</i> og <i>Pseudomonas</i> . Retrospektiv simulering til ~400 avlesninger endret ikke bildet nevneverdig for dominerende arter i prøven, men reduserte påviste arter fra 26 til 16.
17. Anukam et al. ¹⁴²	2006 Nigeria Tverrsnittsstudie 241 friske preMP Inklusjon INA Inndelt etter Nugent 35%N, 51%IM, 14%BV	Taxonrettet PCR DGGE	86% hadde PCR-produkter for <i>Lactobacilli</i> . De 14% uten korrelerte med Nugent score >6. Kvinnene oppviste 1 til 5 DGGE-bånd. 64% kolonisert av <i>L. iners</i> som dominerende art. <i>L. gass.</i> funnet hos 7%, <i>L. plantarum</i> 6%, <i>L. suntoryeus</i> 6%, <i>L. crisp.</i> 3%, andre 13%.
18. Stoyancheva et al. ¹⁴³	2006 Bulgaria Tverrsnittsstudie 30 friske og 10 BV+ 18-45 år	Uselektiv PCR 8F og 1542R ARDRA Ribotyping Taxonrettet PCR	Ingen <i>Lactobacilli</i> påvist i BV-gruppen. Hos de friske var floraen dominert av <i>L.</i> <i>fermentum</i> (27%), <i>plantarum</i> (7%) <i>gasseri</i> (7%) <i>helveticus</i> (7%) <i>crispatus</i> (3%) og andre (20%)
19. Anukam, Reid ¹⁴⁴	2007 Nigeria Tverrsnittsstudie 34 BV+ etter Nugent Inklusjon INA	Uselektiv PCR av V2-V3 i 16S rRNA HDA1 og HDA2 DGGE	Totalt fire bånd ble påvist (1-4 bånd per kvinne), og gav <i>Mycoplasma hominis</i> (35%), <i>Streptococcus</i> sp. (15%), en udyrket bakterie INA (24%), og en organisme tidligere dyrket

			fra ørret (26%). Forfatterne spekulerer i om marine bakterier gjennom mat eller bading kan kolonisere kvinner og bidra til BV.
20. Nam et al. ¹⁴⁵	2007	Korea Tverrsnittsstudie 80 preMP friske (etter klinisk vurdering, BV ikke vurdert etter Amsel eller Nugent)	Dyrkning på MRS og Blodagar. Uselektiv PCR 27F og 1492R DGGE 90% påvisbare LAB. L. Iners 64%, L. crisp. 48%, L. vaginalis 6% og L. rhamnosus 6%. Høy forekomst av E. coli 58%, Enteroc. faecalis 54%, S. epiderm. 34%, Streptococ. 26% og Atopobium v. 13%. Anaerober 10%.
21. Tamrakar et al. ¹⁴⁶	2007	Japan Tverrsnittsstudie 98 friske, 21 IM, 13 BV	Diagnostikk etter Nugent. Dyrkning på blodagar. Taxonrettet PCR <u>Friske</u> : L. crisp. hos 61%, L. iners 40%, L. gass. 34%, L. jens. 30%. <u>IM</u> : L. iners 48%, L. gass. 43%, L. crisp. 29%, L. jens. 19%. <u>BV</u> : L. iners 46%, L. crisp. 15%. BVAB2, Megaspheara, Leptotrichia og Eggerthella-like bakterier assosiert med BV og sterkt assosiert til tilstedeværelse av L. iners (p<0.005 for alle disse)
22. Thies et al. ¹⁴⁷	2007	Tyskland Tverrsnittsstudie PreMP, 50 BV+ og 20 N etter Nugent	Uselektiv PCR av 16S rRNA 27F og 926R T-RFLP Vurderer hensiktsmessigheten av T-RFLP. I <u>N-gruppen</u> kun Lactobacilli, L. crisp (70%) og L. iners (55%), samt L. gasseri (10%). I <u>BV-gruppen</u> betydelig taksonomisk mangfold, med gjennomsnittlig 6.3 OTUs. Atopobium (96%), Megaspheara (68%), L. iners (64%), G. vag (64%) utgjorde et hierarkisk cluster. Andre hyppige TCUs var Prevotella spp (52%), Eggerthella (44%), Peptostrept (34%), Leptotrichia (18%) og BVAB 1 (16%) og BVAB2 (36%).
23. Vitali et al. ¹⁰⁵	2007	Belgia Kohortestudie 26 asymptotiske preMP (23-48 år) vurdert for BV (etter Amsel) og VVC. Tre månedlige kontroller	Uselektiv PCR av V2-V3 i 16S HDA1-GC og HDA2 DGGE Sanntids qPCR Samlet kvantifisering. NI-gruppen dominert av L. iners, L. acidophilus, L. gasseri, L. vaginalis og L. sp. INA. BV-gruppen dominert av Gardnerella, kokker, Atopobium, Megaspheara, Leptotrichia, samt Lactobacillus spp i lavere titer, fremst L. iners. VVC-gruppen dominert av L. iners og L. sp. INA, med et relativt fravær av de normalt lavpopulente bakteriene.
†24. Zhou et al. ¹⁴⁸	2007	USA og Canada Tverrsnittsstudie 144 tilfeldig utplukket fra et utvalg på 3012 sorte og hvite mellom 13 og 40 år. Friske, men ingen undersøkelse utover klinisk inspeksjon.	Ingen dyrkning. Uselektiv PCR 8F og 926R 49F og 926R Kloning Seks hovedcluster identifisert: I L. iners-flora (86-97%), jevnt fordelt mellom sorte og hvite. II L. crisp.-flora (87-93%), hvite RR=2.3. III Få Lactobacilli (0-14%), betydelige fraksjoner av Atopobium (5-28%), Megaspheara (6-12%) og Leptotrichia (0-3%), samt flere andre (24-37%), sorte RR=3.8. IV Blandet Lactobacillus-dominert flora (L. iners, crisp., gass. og jens.), hvite RR=9. V L. gass. og L. crisp., jevnt fordelt mellom sorte og hvite. VI L. crisp. og L. jens., kun hvite.
25. Martinez et al. ¹⁴⁹	2008	Brasil Tverrsnittsstudie 64 friske, 68 VVC (candida), 64 BV	Dyrkning på MRS. Uselektiv PCR 16-1A og 23-1B ARDRA og DGGE. Ingen signifikant forskjell mellom friske og VVC i artsforekomst og -dominans, L. crisp. 42%, L. jens. 19%, L. gass. 16%, L. johnsonii. 14%. BV-gruppen L.

	(Amsel og Nugent)	Peroxid-test	<i>gass.</i> 13 %, <i>L. crisp.</i> 6%, <i>L. johns.</i> 3%. H ₂ O ₂ -produksjon 99% hos friske, 97% hos VVC, 68% hos BV.
†26. Oakley et al. ¹⁵⁰	2008 USA Tverrsnittsstudie 13 friske preMP, 28 BV ved Amsel og Nugent	Uselektiv PCR av 16S rRNA, 338F og 1407R Kloning.	Vurdert mangfoldigheten i floraen, som antall OTUs ved 97% cut-off, hos BV-positive vs friske: 14.8 ± 0.7 vs. 5.2 ± 0.75. Høy interpasient variabilitet, spesielt i BV-gruppen, og fire til fem ganger så mange OTUs på gruppenivå (BV/non-BV) som individgjennomsnitt. Variasjon på phylum-nivå (BV vs. non-BV): <i>Firmicutes</i> (RR=0.45), <i>Actinobacteria</i> (RR=4.5), <i>Bacteroidetes</i> (RR=6.7) og <i>Fusobacteria</i> (kun BV).
27. Wertz et al. ¹¹⁷	2008 USA Longitudinell kasus-kontroll-studie 5 BV ⁻ og 2 BV ⁺ sorte studenter, tidligere skjedeskylere, avga 2-4 månedlige skjedeprøver	Uselektiv PCR av 16S rRNA 27F og 1389R Kloning	De BV ⁻ hadde stabile <i>Lactobacillus</i> -dominerte floraer (>91% av klonene). Den ene friske uten stabil flora, var dominert av <i>L. gasseri</i> . De BV ⁺ hadde større artsrikdom og skift i floraen fra måned til måned (denne fluxen kan bero på at for få kloner er studert hos de BV ⁺ , som har en utjevning i artsdominans). <i>L. iners</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>A. vaginae</i> , <i>Prevotella</i> og <i>Sneathia</i> var de hyppigste BV-bakteriene.
28. Biagi et al. ¹⁵¹	2009 Belgia Kohortestudie 4 månedlige us 23 preMP 23-48 år Modifisert Amsel	Taxonrettet qPCR for <i>Lactobacilli</i> , <i>G. vaginalis</i> , <i>A. vaginae</i> , <i>Prevotella</i> og <i>Veillonella</i> .	26% asymptomatisk BV ved minst et besøk. 35% VVC. Ingen signifikant forskjell i mikroflora mellom friske og VVC, mens BV-gruppen viste kraftig nedgang i <i>Lactobacilli</i> og økning i anaerobene <i>G. vaginalis</i> , <i>A. vaginae</i> og <i>Prevotella</i> . <i>Veillonella</i> ble påvist i lave titere, men i ti ganger høyere konsentrasjon i BV-gruppen (p>0.05 for alle endringer). Synergisme mellom <i>Veillonella</i> og <i>Atopobium</i> , mellom <i>Prevotella</i> og <i>Gardnerella</i> og <i>Prevotella</i> og <i>Atopobium</i> . Mens de friskes mikrobiota viste seg stabile, forble kun én BV+ gjennom hele studien.
29. Garg et al. ¹⁵²	2009 India Tverrsnittsstudie 80 preMP kvinner pH≤4.5, Nugent ≤4	Dyrkning på MRS En koloni utvalgt per skjedeisolat Taxonrettet PCR og RAPD	Av de 80 isolatene utgjorde 14% de homofermentative <i>L. crispatus</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. gasseri</i> og <i>L. acidophilus</i> , mens 85% den heterofermentative gruppen <i>L. reuteri</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. salivarius</i> og <i>L. plantarum</i> samt 5% <i>L. rhamnosus</i> . Ingen isolater hadde lik RAPD-profil.
30. Shi et al. ¹⁵³	2009 Kina Tverrsnittsstudie 5 friske, 27-36 år Prøver tatt på ulikt tidspunkt i menstruasjonssyklus	Uselektiv PCR av 16S rRNA 27F og 1492R Kloning Avlesning av ~300 kloner per kvinne	Alle dominert av <i>Lactobacilli</i> , som utgjorde fra 96.4% til 100% av klonene. Kun <i>L. crisp.</i> (60%) og <i>L. iners</i> (40%) ble funnet i dominant antall. Andre bakterier var <i>L. vaginalis</i> , <i>Prevotella sp.</i> , <i>G. vaginalis</i> , <i>E. coli spp.</i> og <i>Shigella sp.</i>
†31. Verhelst, Verstraelen, Claeys et al. ¹⁵⁴	2009 Belgia Kohortestudie 100 hvite gravide 3 skjedeprøver ved	Mikroskopisk gradering etter Claeys kriteria ¹³¹ Dyrkning på	Grad Ib RR=9.5 for konvertering til abnormal flora sammenliknet med Ia og lab. <i>L. crisp.</i> -dominert flora, bedømt ved T-RFLP, var dyktigere til å opprettholde grad I mikroflora

		gjennomsnittlig uke 8.8, 21.2 og 32.4	blodanrikt Shaedler agar Taxonrettet PCR T-RFLP	enn <i>L. jens.</i> (OR=12) og <i>L. iners/gass.</i> (OR=23), og var mer stabilt til stede gjennom graviditeten (7.7% frafall) enn <i>L. jens.</i> (20% frafall) og <i>L. iners/gass.</i> (30.2% frafall)
†32. Yamamoto, Zhou et al. ¹⁵⁵	2009	USA og Canada Tverrsnittsstudie 54 hvite, 36 sorte 13-18 år Inkludert data fra en tidligere studie ¹⁴⁸ . Friske, men ingen undersøkelse utover klinisk inspeksjon.	Ingen dyrkning. Uselektiv PCR 8F og 926R Kloning	Identifiserte fem skjedefloracuster: I <i>L. iners</i> -flora (totaldominans (a) eller lavere dominans (b)) 42%. II <i>L. crispatus</i> -flora 22%. III Blandet <i>Lactobacillus</i> -dominert flora (<i>L. crisp.</i> , <i>gass.</i> og <i>jens.</i>) 16% IV Fravær av <i>Lactobacilli</i> og relativt høy andel <i>Atopobium</i> , <i>Gardnerella</i> og <i>Megasphaera</i> 17%. Ingen signifikant forskjell fra clusterene som ble identifisert hos voksne kvinner ¹⁴⁸ .
33. Zhou et al. ¹⁵⁶	2009	USA Tverrsnittsstudie 73 japanske 18-45 år Friske, men ingen undersøkelse utover klinisk inspeksjon	Uselektiv PCR 8F og 926R 49F og 926R T-RFLP og kloning Sekvensering av ~100 kloner	Kun analysert fylotyper som utgjorde >1% av bakteriene i prøvene. <i>L. crisp.</i> i dominerende antall hos 40%. <i>L. iners</i> hos 28%. Inndelt i 7 clustere. Ingen store forskjeller ble funnet mellom hvite og japanere, unntatt en relativt stor gruppe med <i>A. vaginalis</i> -dominert flora blant japanere (13%).
34. Branco et al. ¹¹⁸	2010	Brasil Tverrsnittsstudie 16 friske 30 BV-neg med genitale plager 32 BV-pos etter Amsel	Dyrkning på MRS agar Uselektiv PCR av 16S-23S 16-1A og 23-1B ARDRA	Av de friske var 88% kolonisert av <i>Lactobacilli</i> i dominante mengder, blant BV- og BV+ 66% (signifikant forskjell). 1.94 <i>L. sp.</i> per individ. <i>Lactobacilli</i> fra friske hadde høyere antagonistisk evne enn de fra syke BV- og BV+. Dette gjaldt også for samme <i>Lactobacillus</i> species (f.eks. <i>L. crisp.</i>).
†35. Hummelen et al. ¹³²	2010	Tanzania Tverrsnittsstudie og longitudinell studie 272 HIV-positive 132 screenet for BV med Amsel og Nugent - 39 av 67 BV-positive behandlet med metronidazol og fulgt videre ved 2, 5, 15 og 25 uker.	Uselektiv PCR av V6 i 16S rRNA Oppgitt sekvens, men ikke posisjon av primere Illumina pyrosekvensering Snitt 41'000 avlesninger per prøve	Foregangsstudie for Illumina pyrosekvensering. 207 (76%) falt innenfor 8 clustere: I <i>L. iners</i> -flora (frisk) II <i>L. iners</i> & <i>G. vaginalis</i> (IM & BV) III <i>L. crispatus</i> (frisk) IV <i>Lachnospiraceae</i> & <i>Veillonellaceae</i> (BV) V <i>G. vaginalis</i> (BV og IM) VI <i>Prevotella bivia</i> (BV) VII Diverse bakterier (BV) VIII <i>Lachnospiraceae</i> (BV) Metronidazolbehandling førte til et skifte i floraen, uten nødvendigvis reetablering av gammel flora eller opphevelse av BV-status, men relativ økning i <i>L. iners</i> .
†36. Ling et al. ²⁶	2010	Kina Tverrsnittsstudie 50 friske og 50 BV ⁺ etter Amsel og Nugent	Uselektiv PCR av V3 i 16S rRNA, 341F og 534R DGGE 454 pyrosekvensering ~2500 avlesninger á ~145 bp per individ qPCR	Toneangivende pyrosekvenseringsstudie. Friske kvinner totalt dominert av <i>Firmicutes</i> . Tre andre phyla – <i>Bacterioides</i> , <i>Actinobacteria</i> og <i>Fusobacteria</i> samt åtte gener – <i>Gardnerella</i> , <i>Atopobium</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Eggerthella</i> , <i>Aerococcus</i> , <i>Leptotrichia</i> , <i>Prevotella</i> og <i>Papillibacter</i> ble identifisert og korrelert til BV (p<0.05). BV ⁺ kvinner hadde langt større mangfold av OTUs, ca. dobbelt så mange ved samme antall avlesninger. <i>Lactobacilli</i> dominerte 95% av frisk flora, mot 8% av BV ⁺ -flora.
†37. Ravel et al. ¹⁵⁷	2010	USA Tverrsnittsstudie	Uselektiv PCR av V1-V2 i 16S rRNA,	Toneangivende høyprosesserings pyrosekvenseringsstudie. Identifiserer fem

		96 asiatiske, 97 hvite, 104 afro-, 97 latinoamerikanske Nugent og pH målt	27F og 338R 454 pyrosekvensering ~2200 avlesninger á ~240 bp per individ	clustere, cf. Zhou et al. ¹⁴⁸ . I <i>L. crispatus</i> -flora, II <i>L. gasseri</i> -flora III <i>L. iners</i> -flora IV Relativt fravær av <i>Lactobacilli</i> og stor artsrikdom. V <i>L. jensenii</i> -flora. Høyest andel hvite i cluster I og høyest andel afro- og latinoamerikanske i cluster IV, med hhv negativ og positiv korrelasjon til høy pH og Nugent.
†38. Zozaya- Hinchliffe et al. ¹⁵⁸	2010	USA Tverrsnittsstudie 37 afroamerikanske kvinner rekruttert i en STI-klinikk, 13 N, 8 IM, 16 BV Vurdert etter Amsel og Nugent	Taxonrettet qPCR for <i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i> , <i>G. vag.</i> , <i>A.</i> <i>vag.</i> , BVAB1-3, <i>Megasphaera</i> , <i>Leptotric./Sneathia</i> , <i>Eggerthella</i> , <i>Peptostr.</i> , <i>Prevot.</i> , <i>Mobiluncus</i> , <i>Mycopl. hominis</i>	<i>L. iners</i> ble påvist hos samtlige kvinner i alle grupper. Øvrige <i>Lactobacilli</i> falt alle i prevalens fra N-gruppen til BV-gruppen. BV-gruppen hadde 10 ganger høyere konsentrasjon av bakterier enn N-gruppen, og høyere konsentrasjon ($p < .05$) av alle andre bakterier enn <i>Lactobacillus spp.</i> , unntatt <i>Mobiluncus</i> . <u>Alle bakterier ble påvist</u> <u>i N-gruppen</u> (fra 15% BVAB3 til 100% <i>Prevotella</i>) og i BV-gruppen ble alle bakterier <u>derimot påvist hos 100%</u> . Unntatt <i>Mobiluncus curtisii</i> (75%) og <i>mulieris</i> (81%), BVAB1 (94%) og 3 (94%), samt <i>Mycopl.</i> <i>hominis</i> (81%).

ARDRA: Amplified ribosomal DNA restriction analysis. LAB: Lactic acid bacteria. MP: Menopausal RAPD: Random amplification of polymorphic DNA. TTGE: Temporal temperature gel electrophoresis.

Bruk av hormonell prevensjon bør være et eksklusjonskriterium, eller bør i alle fall opplyses. Ingen av studiene har sørget for å ta prøve av samme kvinne på samme dag i menstruasjonssyklus, men opplyser ofte at de er fra forskjellige tidspunkt i syklus. Som regel ekskluderes kvinner under menstruasjon. Det er stor variasjon i prøvetakings- og ekstraksjonsmetode. Forskjellige primerpar brukes i ulike studier, men samme forfattere bruker ofte samme primersett i senere studier. Pyrosekvensering er nå the state of the art, og et langt mektigere verktøy for å påvise artsrikdom enn DGGE og T-RFLP, som gjennomgående gir mer konservative anslag.

Diskusjon

Gjennom de siste ti årene, og spesielt etter introduksjonen av uselektiv PCR av 16S rRNA, har det skjedd et paradigmeskifte innen synet på skjedens mikrobiologi. De nye teknikkene har gjort det mulig å påvise kresne, ikke-dyrkbare bakterier, og har gitt muligheten for en langt mer detaljert klasifisering av fylotyper, basert på bakterienes genom. Dette betyr ikke at vi kan overse de tidligere studiene, men deres bidrag har anskueliggjort toppen av isfjellet, de har konsentrert seg om dominante og allerede kjente arter i skjedefloraen. Frem til 2005 var det vanlig å se på frisk skjedeflora som et relativt smalt økosystem med tilstedeværelse av en eller to dominerende *Lactobacillus spp.*, samt noen få intestinale bakterier i mindre antall. Hyman et al. reviderte dette bildet, da de økte lengden på amplifikasjonsfragmentene og sekvenserte amplifisert DNA med langt høyere dekning, av størrelsesorden 2000 avlesninger per individ¹⁴¹. Verhelst et al.¹⁰⁷ og Zhou et al.⁵ hadde tatt i bruk kloningsteknologien tidligere, men bare avlest ~100-200 kloner per individ. De hadde også tydeliggjort fallgruvne med den nye teknologien, med ulike resultater ved bruk av ulike "universelle" primerpar, og til og med ved å endre antallet amplifikasjonsrunder¹⁰⁷. Selv om utvalget i Hymans studie fortsatt var lite, og selv om de ikke foretok noen standardisert BV-evaluering for å validere at kvinnene hadde en frisk skjedeflora, viste de at minoriteten av opplevd friske kvinner var totaldominert av *Lactobacilli*, og at selv disse utviste signifikant sekvensdivergens. Halvparten av kvinnene oppviste videre

en blandet *Lactobacillus*-dominert flora, med tilstedeværelse av bakterier tidligere assosiert med syk flora og indikatorer på BV. Retrospektiv simulering til ~400 avlesninger endret ikke bildet for de dominerende artene i prøvene, men reduserte altså påviste arter fra 26 til 16. Dette var en påminnelse om behovet for mer sensitiv avlesningsteknikk, skulle man oppnå større forståelse for hva som er normal skjedeflora og hva som utgjør reservoaret av opportunistiske og potensielt patogene arter. Dette vil være helt avgjørende for å få innsikt i hvilke faktorer som kan knyttes til ervervelsen av BV-assosiert mikroflora. Man kan ikke kun konsentrere seg om toppen av isfjellet og ignorere det som ligger under overflaten. Dette innebærer at tidligere studier, som har tatt i bruk uselektiv PCR med få avlesninger, og som kun har oppgitt forekomst og ikke konsentrasjon av bakterier, ikke lenger har noen sentral nytteverdi, fordi de er erstattet av mer sensitiv påvisning og mer intensiv avlesning. Her må vi ta utgangspunkt i de seneste pyrosekvenserings-studiene, som er blitt den nye state of the art. Hvis vi derimot er ute etter å se på forekomsten av de dominerende species, har de større nytte, fordi lavpopulente bakterier som utgjør <1% av prøven da kan ignoreres.

Den rådende klonalitetsteorien for *Lactobacillus*-dominans, støttet av studier som Pavlova et al.¹³³, står også for fall. Selv om skjeden oftest er kolonisert av en eller i høyden to eller tre *Lactobacillus* spp., fant Hyman et al. at disse utgjorde et titalls forskjellige subspecies. Disse har vist seg å ha fenotypisk distinkte trekk og ulik evne til antagonisme¹¹⁸. Det er grunn til å tro at med ytterligere sensitiv og differensiert teknikk, vil man trenge dypere ned i menneskets metagenom og påvise et enda større og dynamisk mangfold av fylotyper. Sterk konkordans av ulike subarter av *Lactobacilli* og *Lactobacilliales* har også siden blitt vist i den nyeste høyprosesseringsstudien til Ravel et al.¹⁵⁷ Hyman et al. poengterte også betydningen av å oppgi antall avlesninger av en gitt sekvens i prøven, framfor % dominans i floraen, ettersom et høyt antall avlesninger kun delvis må forstås å reflektere antallet bakterier i prøven. Effektiviteten av oppkopiering med de ulike primerne er som kjent ikke lik for alle DNA-sekvenser, da de kan feste mer eller mindre godt. Ling et al. forsøkte å unngå dette problemet med å ta i bruk qPCR i tillegg²⁶, som nå har blitt den nye "state of the art".

Siden 2005 har altså flere studier sett på artsrikdommen i skjeden mikroflora, særlig Oakley et al.¹⁵⁰ og de nyeste pyrosekvenseringsstudiene^{26,132,157}. Sammenfattet har disse påvist betraktelig variasjon mellom personer, både i mangfold generelt og i arter spesielt, og videre påpekt en betydelig overlapping mellom kvinner med og uten forstyrrelser i floraen. På populasjonsnivå ser man imidlertid et langt rikere artsmangfold ved BV, og de tradisjonelt BV-assosierte bakteriene forekommer her også i høyere titere. Tankevekkende nok gjelder det samme for afro- og latinamerikanske kvinner, som av uavklarte årsaker også har høyere forekomst av BV, sammenliknet med hvite og asiatiske. De førstnevnte oppviser tilstedeværelse av flere dominerende arter og genera til samme tid, cf. clusterene til Zhou et al.¹⁴⁸ og Ravel et al.¹⁵⁷. I hvilken grad disse asymptomatiske kvinnene også har en økt absolutt bakterietetthet, slik som sees ved BV, er dessverre ikke beskrevet. Tradisjonelt har en *Lactobacillus*-dominert flora blitt antatt å være mer helsefremmende enn en blandet flora. Selv om skjedebakteriepopulasjonene i studiene over har et relativt fravær av *Lactobacilli*, har de et høyt antall av andre syreproduserende bakterier, først og fremst *Atopobium vaginae*, *Megasphaera*, *Leptotrichia* og *Streptococcus*, som kan tenkes å bidra til å opprettholde viktige funksjoner. Hos de kvinnene som naturlig koloniseres av disse artene fremfor *Lactobacilli*, kan det tenkes at de fremmer sunnhet og ikke sykdom. Vi vet ikke om disse populasjonene nødvendigvis må være mindre funksjonelle, og når Ravel et al. finner at 40% av afro- og latinamerikanske kvinner har en slik flora (fire ganger så mange som hvite), blir det høyst problematisk å hevde at dette er en syk skjedeflo-

ra¹⁵⁷. De samme folkegruppene har i samme studie en oppsiktsvekkende høy pH i vaginalfluor (hhv. 4.7 ± 1.04 og 5.0 ± 0.59 vs 4.2 ± 0.3 for hvite), og gjennomgående høy Nugentscore. Vi må derfor stille oss spørsmålet om tradisjonell BV-diagnostikk ved Nugents kriteria (og hele BV-begrepet for den saks skyld), som jo baserer seg på tilstedeværelsen av *Lactobacilli*, enten er mer hensiktsmessig brukt på hvite, eller om utvalget i studien har inkludert uforholdsmessig mange med asymptomatisk BV.

Oakley et al. tar til orde for at synet på mangfoldet i menneskets mikrobiom hemmes på grunn av underestimering ved at man i de fleste studier attribuerer sekvenser til kjente taksonomiske grupper i databasene, basert på beste treff, og at man ikke isteden oppgir OTUs eller artsmangfold definert etter en avskjæring på 97-99% sekvenslikhet. Etter en slik definisjon fant de for eksempel 21 forskjellige OTUs innen GenBanks *Prevotella sp*¹⁵⁰. Dette gjelder som nevnt også for *Lactobacilli*. Enda mer frustrerende er det å vite at vi har så godt som ingen kunnskap om hvilken funksjonell betydning disse genulikhetene har, med tanke på f.eks. tilpasning til vertens skjedeflora og protektivt eller sykdomsfremkallende potensiale. Vi vet heller ikke hvorfor den taksonomiske sammensetningen i bakteriefloraen er så forskjellig fra person til person både innen gruppen med og uten BV; om stokastiske forskjeller kan generere et slikt mønster, eller om det er faktorer i kjemisk og fysisk miljø hos verten som kan tilskrives slik som diett eller immunologiske faktorer, eller eventuelt hormonell status og uttrykk av ligander på skjedepitelet for adhesjon, som igjen selekterer undergrupper av bakterier. Det kan synes som om kvinner med BV i likhet med kvinner med frisk flora utvikler hver sine individuelle, dynamiske profiler av bakterier. Dette kan forklare hvorfor noen kvinner responderer godt på antibiotika og andre ikke. BV-floraene er imidlertid langt mindre stabile over tid, hvilket er demonstrert i de longitudinelle studiene til Wertz et al.¹¹⁷ og Biagi et al.¹⁵¹ Den store fluktuasjonen i bakteriearter kan også skyldes at disse kvinnene nettopp har en utjevning i konsentrasjon, og at man derfor grunnet få avlesninger fanger opp vilkårlige utsnitt. Longitudinelle studier har på den annen side også vist at en *Lactobacillus*-dominert flora kan skifte fra å domineres av en species til en annen. I studien til Wertz et al. gikk for eksempel en under hele observasjonstiden frisk kvinne fra 98% *L. iners*-dominans til 93% *L. crispatus*-dominans i løpet av en måned¹¹⁷. En meget interessant, ny studie av Srinivasan et al. har sett på dynamikken i kvinnens skjedeflora målt med qPCR gjennom menstruasjonssyklus, samt av skiftet i flora hos kvinner med BV etter metronidazolbehandling¹². De viste en økning i *G. vaginalis* under menstruasjon og fall i *L. crispatus* og *L. jensenii*, mens *L. iners*-konsentrasjonen var uavhengig. Antakelig fungerer jern som en vekstfaktor for *G. vaginalis*, og at dette skaffes ved lysis av erytrocytter under menstruasjon gjennom toxinet vaginolysin (se under) virker plausibelt. Dette stemmer også med observasjonen at BV forverres og gjerne blusser opp igjen under første menstruasjon etter endt behandling. Vi vet også fra epidemiologiske studier at hormonell prevensjon, som reduserer blødningsmengden, beskytter mot utvikling av BV⁹⁷. Kvinnene som ble gitt metronidazol responderte forskjellig og utviklet nye individuelle profiler, lik de i studien til Hummelen et al.¹³². Felles var et raskt fall i konsentrasjonen av de BV-assosierte bakteriene, men mens den ene utviklet *L. jensenii*/*L. iners*-dominans, utviklet den andre etter bare få dager en ny topp av *G. vaginalis* og *L. iners*, og ved neste menstruasjon økte igjen de BV-assosierte *A. vaginae* og *Leptotrichia* dramatisk. Hva som styrer disse ulikhetene i respons og gjenopprettingen av BV-assosierte bakterier, er fundamentale ubesvarte spørsmål.

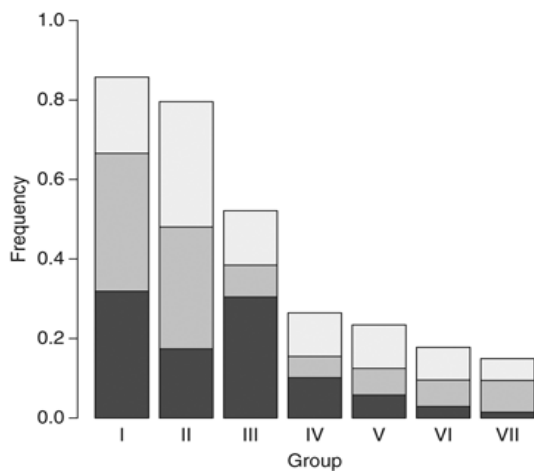
Hvis skjedens bakteriesamfunn inneholder 10^8 bakterier per mL vaginalfluor, vil "sjeldne" arter, i konsentrasjoner opp til 10^5 bakterier per mL ikke kunne påvises i studiene med uselektiv PCR.

Vi vet derfor strengt tatt ikke om artsmangfoldet faktisk er rikere, eller om de samme artene ville kunne påvises med mer sensitiv avlesningsteknikk, og at det kanskje heller er et relativt fravær av dominans, med mer utjevning i konsentrasjon mellom artene, på bekostning av *Lactobacilli*, som fører til artsrikdommen ved skjedefloraforstyrrelser. På samme måte som at de kresne anaerobene, som tidligere ble sett på som et BV-fenomen, nå må antas som normalt forekommende hos friske. Studier med ytterligere intensiv analyse og høyere antall avlesninger er derfor nødvendig for å oppnå fullstendig klarhet i dette. Ved en fastsatt deteksjonsterskel, slik som 10^5 bakterier per mL, er det imidlertid en statistisk signifikant forskjell i tilstedeværelse av antall fylotyper hos kvinner med BV sammenliknet med kvinner med frisk flora definert etter Nugent, og dette er et gjennomgående funn i alle studier. I Zozaya-Hinchliffe et al. sin studie av afromerikanske kvinner ble meget sensitiv taxonrettet qPCR tatt i bruk¹⁵⁸. Disse påviste alle BV-assosierte bakterier i normalgruppen, (fra 15-100%), men påviste imidlertid de samme bakteriene hos samtlige (100%) i BV-gruppen. Når konsentrasjonen av disse bakteriene nådde en angitt terskelverdi, fant de p-verdier <0.0001 for samtlige *A. vaginae*, BVAB1, 2 og 3, *Megasphaera*, *Eggerthella sp.*, *Leptotrichia/Sneathia* og *Prevotella spp.* for BV-diagnose både med Nugentscore og Amsels kriterier. *G. vaginalis* oppnådde p-verdi på 0.0007 for BV ved Nugent og 0.0031 ved Amsel. Dette er en klar demonstrasjon av det diagnostiske potensialet ved qPCR, som vil måtte fortrenge mikroskoperingsdiagnosene. En sentral innvending er at deteksjonstersklene ble fastsatt etter dataanalysen, og at qPCR i samme studie ikke var velegnet til å skille intermediær flora (NS 4-6) fra BV (NS>6). Det må derfor samtidig tas stilling til hvorvidt denne kategorien utgjør en egen entitet, som det er formålstjenlig å skille ut i klinisk praksis, og de angitte terskelverdiene må valideres. Å skille mellom syke og friske skjedefloraer definert etter terskelverdier for BV-assosierte nøkkelbakterier vil på den annen side ha stor nytte i forskningssammenheng, da det kan gi et langt mer differensiert bilde av hvilke BV-mikrobeprofiler som er spesielt knyttet til slik som behandlingsresistens og komplikasjoner, og som derfor kanskje kan påvise preventive tiltak og resultater i mer hensiktsmessig oppfølging av kvinner med BV.

En alternativ strategi av å beskrive bakteriesamfunnene etter fineste mulige taksonomiske diskriminasjonsmetode, er å aggregere data i høyere taksonomiske grupper^{26,150}. Gjennom dette unngår en uløste problemer i forhold til klassifisering av mange BV-relaterte arter og slekter, og både Oakley et al. og Ling et al. har påpekt en statistisk signifikant sammenheng mellom sekvenskonsentrasjon fra *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* og *Fusobacteria* knyttet til BV og *Firmicutes* knyttet til frisk flora. Dette åpner også opp for et diagnostisk utnyttelsespotensiale, da disse bakteriesamfunnene gjenspeiler seg i hver sine DGGE-clusterprofiler, som tilkjennegir store skift i bakteriepopulasjonene²⁶. De sentrale BV-assosierte bakteriene som går igjen i de nye studiene, og som bør inngå, er *G. vaginalis*, *A. vaginae*, BVAB1, 2 og 3, *Megasphaera spp.*, *Eggerthella sp.*, *Leptotrichia/Sneathia*, *Peptostreptococcus sp.* og *Prevotella spp.*, som altså med mer sensitiv teknikk antas å påvises hos alle med BV.

Zhou et al. har i to studier sammenliknet hvite, japanske og afroamerikanske kvinner i clusteranalyser. I figur 1 er disse samlet i et søylediagram. I figur 2 er skivediagram fra studien til Ravel et al gjengitt. Denne har også inkludert latinamerikanske kvinner.

Figur 1. Clusterinndeling av skjedefloraen hos kvinner i ulike etniske grupper, gjengitt fra Zhou et al.¹⁵⁶



Over. Etter Zhou et al. (n= 217).

Sort: Afroamerikanske. Grå: Hvite. Lys: Japanske.

I: *L. iners*-dominans. II: *L. crispatus*-dominans. III: Blandet *Lactobacillus*-fattig flora. IV: *A. vaginae*-dominans, samt *L. iners*. V: *L. gasseri*-dominans. VI: Blandet *Lactobacillus*-dominert flora og VII: *L. jensenii*-dominans

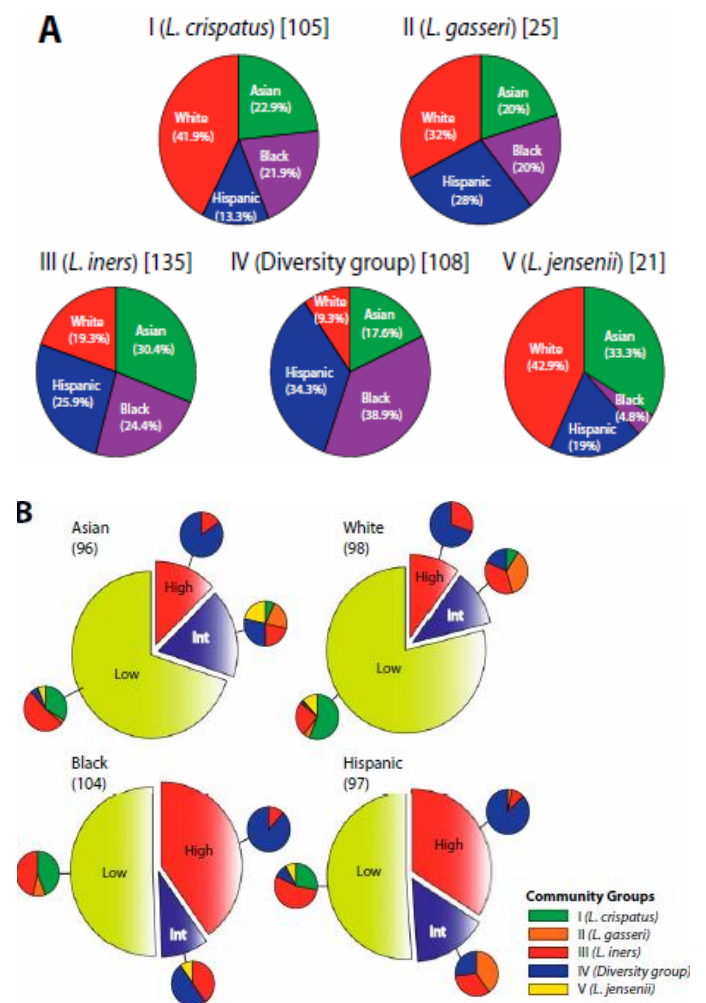
Til høyre. Etter Ravel et al. (n=395).

Øverst: Clustere inndelt etter folkegruppe.

Rød: Hvite. Grønn: Asiatisk. Lilla: Afroamerikanske. Blå: Latinamerikanske.

Nederst: Folkegrupper inndelt etter Nugent score og cluster. Lys grønn: 0-3. Blå: 4-6. Rød: 7-10.

Figur 2. A. Clusterinndeling av skjedefloraen hos ulike etniske grupper, gjengitt fra Ravel et al.¹⁵⁷



L. jensenii og *L. gasseri* er mindre hyppig forekommende clusterer enn *L. crispatus*, *L. iners* og blandede floraer. Dette stemmer med så godt som alle tverrsnittsstudier av *Lactobacillus*-forekomst, som gjennomgående finner *L. iners* og *L. crispatus* i flest floraer etterfulgt av *L. gasseri* og *L. jensenii*, mens andre *Lactobacillus* spp. er sjeldnere, og antakelig så godt som aldri i dominant antall. *L. gasseri*-dominert flora fordeler seg noenlunde likt mellom alle folkegrupper, mens *L. jensenii* er vanligst hos hvite, etterfulgt av asiatiske, så latinamerikanske, og sjelden hos afroamerikanske.

Unntakene fra mønsteret over er studiene til Wilks et al.¹²⁶ og Stoyancheva et al.¹⁴³. Studien til Wilks et al. er interessant, fordi de så på kvinner som allerede har født for tidlig. De fant at *L. gasseri* var hyppigst forekommende. Som vi ser over, er *L. gasseri* korrelert til intermedier flora hos alle folkegrupper unntatt hos afroamerikanske, cf. Backer, Verstraeten, Verhelst et al., som tar til orde for at *L. gasseri* representerer en annen entitet enn *L. crispatus/jensenii*-dominert flora og *L. iners*-dominert flora, og som er sterkt korrelert til labil, intermedier flora i svangerskap^{131,154,159}. Wilks et al. vurderte imidlertid ikke *L. iners*, da de tok i bruk dyrkning på MRS-agar, og dette er en betydelig svakhet ved studien. Stoyancheva et al. så på *Lactobacillus*-koloniseringen hos bulgarske kvinner, og

fant meget overraskende de heterofermentative *L. fermentum* og *L. plantarum* på topp, etterfulgt av 7% *L. gasseri*, og kun 3% *L. crisp*. Det var en liten studie (n=30), og det finnes dessverre ingen andre studier på østeuropeiske kvinner. Vi vet derfor ikke om disse funnene er tilfeldige, skyldes seleksjon eller metodiske svakheter, eller om de representerer faktiske demografiske ulikheter. Det er imidlertid grunn til å forholde seg kritisk til funnene.

L. crispatus forekommer hyppigst hos hvite, etterfulgt av asiatiske kvinner, og i minst antall hos afroamerikanske og latinamerikanske. Dette er et gjennomgående funn, og støttes av andre studier som har sett på forekomst av *Lactobacillus* i hhv. vesteuropeiske og afrikanske folkegrupper. *L. crispatus* er for øvrig sjelden dominant hos BV⁺.

Det er en vesentlig forskjell i rapportert forekomst av *L. iners* mellom Zhou et al. og Ravel et al. *L. iners* er hyppig i gruppen afroamerikanske og latinamerikanske kvinner, noe lavere hos hvite, og hyppigst blant asiater. Ling et al. behandler i sin studie *Lactobacilli* samlet, men rapporterer *L. iners* som den hyppigst forekommende arten hos kinesiske kvinner, både i N-gruppen og BV-gruppen²⁶. Nam et al. (Korea, n=80) fant *L. iners* hos 68% og *L. crisp* hos 48%¹⁴⁵, mens Tamrakar et al. (Japan, n=98) fant *L. crisp* hos 61% og *L. iners* hos 40%¹⁴⁶, hvilket til dels støtter funnet til Zhou et al. Det er altså mulig at det er forskjeller mellom japanere og andre asiater, med relativt høyere forekomst av *L. crispatus* og mindre *L. iners* hos japanere, mer likt et vesteuropeisk mønster. Latinamerikanske kvinner har samme forekomst av *L. iners* som afroamerikanske. De to studiene som er gjennomført i Brasil, av Branco et al.¹¹⁸ og Martinez et al.¹⁴⁹, har dessverre begge tatt i bruk dyrkning på MRS-agar, hvilket derfor har utelatt *L. iners*. En annen gjennomgående observasjon er at *L. iners* ses i hele Nugent-spekteret.

Blandet, *Lactobacillus*-fattig flora (inklusive cluster IV, *A. vaginae*-dominert flora, i studien til Zhou et al.¹⁵⁶) er vanligst hos afro- og latinamerikanske kvinner, etterfulgt av asiatiske som havner i en mellomstilling mellom afroamerikanske og hvite. Ifølge Zhou et al. har japanere spesielt høy forekomst av *A. vaginae*-dominert flora. Hvilke av floraene over som kan tenkes å ha spesielt høy risiko for utvikling av svangerskapskomplikasjoner, og som står for de vi ser i epidemiologiske studier av BV, vet vi ikke. Men vi kan postulere at de som har floraer dominert av melkesyreproduserende bakterier, slik som *A. vaginae* og *Megasphaera*, men uten biofilmdannende *G. vaginalis* (se under) kan ha en funksjonell flora som bl.a. ivaretar skjedens surhet og intrinsiske antimikrobielle forsvar, og som bør behandles som distinkt fra bakteriell vaginose.

Ved høy Nugent-score er blandet, *Lactobacillus*-fattig flora og *L. iners*-dominert flora gjennomgående i alle folkegrupper. En vesentlig bemerkning er at alle studier som påviser *Lactobacilli* hos kvinner med BV, konstaterer at disse er kolonisert med *L. iners*. Den absolutte konsentrasjonen er opprettholdt, selv om dominansen forsvinner; *L. iners* eksisterer altså side om side med BV-floraen, og må være fullstendig adaptert til det endrede miljøet. Dette gjelder også intermedier Nugent-score, men her forekommer også *L. gasseri* hyppigere. Dette stemmer også med at *L. gasseri* er korrelert til labilitet og intermedier flora i andre studier (se over). Det er imidlertid ikke dermed sagt at *L. iners* fremmer BV. Kun at *L. iners* ses ved BV, og gjerne overtar som dominerende *Lactobacillus* når BV oppstår, fordi den er bedre tilpasset enn de andre *Lactobacillus spp.* Flere longitudinelle studier med mer kontinuerlig monitorering av bakteriekonsentrasjoner er påkrevd for å si mer om hvilke ytre forhold som fremmer veksten av hvilke *Lactobacillus spp.*

Burton et al. har beskrevet skjedefloraen hos postmenopausale kvinner med og uten HRT. De viste at melkesyrebakteriene er tilstede, men i lavere antall ved østrogenfravær¹¹⁶, og at det pre-

menopausale mønsteret med *Lactobacillus*-dominans oppnås ved østrogenterapi¹³⁸. De vurderer at Nugents kriterier ikke er adekvat for å vurdere skjedefloraen hos disse kvinnene, hvor prevalensen av abnormal flora er 70%. Ettersom HRT viser seg å forebygge infeksjon hos postmenopausale, både i form av skjedepåler og UTI, kan det inngå i totalvurderingen om hvorvidt slik behandling skal gis. Det er noen interessante studier på østrogenterapi i kombinasjon med probiotika hos premenopausale som har vist at dette er effektivt for å forebygge og behandle BV, og like effektivt som standard antibiotikabehandling^{160,161,162}. Østrogenholdig hormonell prevensjon har i motsetning til rene gestagenpreparater også vist seg å ha en protektiv effekt mot BV¹⁶³, med åpenbar klinisk relevans ved samtidig prevensjonsveiledning. Det er spekulert i om dette kan henge sammen med østrogendrevet oppregulering av ligander for de protektive melkesyrebakteriene. Dette er utvilsomt et felt det bør forskes mer på.

Et interessant felt vil også være studier på skjeds og livmorhalsens mikrobiota ved BV, cervisitt og blandet infeksjon, som utvilsomt kan ha relevans for utvikling av oppadstigende infeksjon og svangerskapskomplikasjoner. I en ny pionerstudie av Ling et al. med bruk av qPCR ble det imidlertid ikke funnet noen statistisk sammenheng mellom en BV-assosiert bakteriesammensetning på ectocervix og inflammasjon i cervix, selv om det ble funnet distinkte bakterieprofiler i hver av gruppene frisk, BV, cervisitt og cervisitt + BV for både vagina og ectocervix¹⁶⁴.

BV-assosierte enkeltbakterier

Gardnerella vaginalis

Gardnerella vaginalis er en fakultativ anaerob bakterie i familien *Bifidobacteriaceae*, phylum *Actinobacteria*. Den ble antatt å være det ene patologiske agens for BV og gitt navnet *Haemophilus vaginalis* av Gardner og Dukes i 1955. Siden ble den reklassifisert innen *Corynebacterium* og deretter tatt inn i familien *Bifidobacteriaceae*, siden *Bifidobacterium* er dens nærmeste slektning. De ses som små ikke-motile pleomorfe staver, som kan ha pili. Selv om den farger negativt i grampreparat viser elektronmikroskopi et grampositivt peptidoglykanlag¹⁶⁵. *G. vaginalis* er en kresen og langsomt voksende bakterie, hvilket kan være en medvirkende årsak til at isoleringsfrekvensen i ulike studier varierer så sterkt. *G. vaginalis* er med mer sensitive molekylærbaserte teknikker vist å være tilstede i omkring 95-100% av tilfeller med BV, og hos opptil 70% av friske, men da i lavere titere^{114,158}. Kvantifisering av mengden *G. vaginalis* er imidlertid vist å kunne inngå som komponent i molekylærbasert diagnostikk av BV¹⁶⁶.

At *G. vaginalis* eksisterer i ulike biotyper, med ulik isoleringsfrekvens fra BV-positive og BV-negative kvinner, har vært kjent lenge¹⁶⁷. Interessen for deres virulens og patogene potensiale fikk imidlertid en ny renessanse etter oppdagelsen av en BV-assosiert biofilm dominert av *G. vaginalis*¹⁶⁸, og genomet til flere subtyper har nylig blitt sekvensert og studert som en del av Mikrobiomprosjektet (HMP)¹⁶⁹. In vitro modellstudier er også i ferd med å avdekke den molekylære basis for dens cytotoxicitet, med produksjon av vaginolysin, adheranse til vaginaepitel og biofilmdannelse¹⁷⁰. Det er postulert at *kohesiv*, biofilmdannende *G. vaginalis* kan være den initiale kolonidanner, som andre anaerobe BV-assosierte bakterier, fremfor alt *A. vaginae*, kan slå seg ned på^{170,171}. Dette kan utvikle seg raskt og endre skjedeoverflaten til høy pH uten *Lactobacilli*, som begynner å uttrykke uheldige inflammatoriske faktorer. Verstraalen har knyttet den polymikrobielle naturen ved BV til fenomenet

quorum sensing; at bakterier i et synergistisk fellesskap kommuniserer med hverandre gjennom spesifikke signalmolekyler, som virker på genekspresjon, slik at de virker sammen, heller enn som individuelle celler⁴⁹. Kanskje kan *G. vaginalis*, innstøpt i sin biofilm, indusere et faseskifte hos andre anaerobe bakterier i skjeden, slik at de sammen kan fremme BV. Dette er en interessant hypotese som bør avklares nærmere.

Atopobium vaginae

Atopobium ligger innen phylum *Actinobacteria*, og er en ny slekt av strikte anaerobe, melkesyreproduserende bakterier, etablert i 1992 etter reklassifiseringen av to *Lactobacillus spp* og en *Streptococcus sp.* I 1999 ble en ny, udyrket *Atopobium sp* påvist i skjeden hos en frisk, svensk kvinne og gitt navnet *Atopobium vaginae*¹⁷². Den ble funnet å være følsom for klindamycin og meget resistent mot metronidazol¹⁷³. Siden da har *A. vaginae* blitt påvist hyppig, og langt hyppigere i skjeden hos kvinner med BV eller *Lactobacillus*-fattig skjedeflora¹⁰⁷. Fredricks et al. fant *A. vaginae* hos 89% i BV-gruppen og 0% i kontrollgruppen¹¹⁵, Thies et al. hos 96% i BV-gruppen og 0% i kontrollgruppen¹⁴⁷. Ling et al. angav en forekomst på 84% blant BV⁺ mot 22% blant BV⁻, men med høyere konsentrasjon hos BV⁺²⁶. *A. vaginae* ser imidlertid ut til å være en viktig bakterie i clusterene med relativt *Lactobacillus*-fravær med høyere forekomst blant afroamerikanske enn hvite. Det er også senere vist at det eksisterer en rekke underarter, med mulig ulik kommensal eller patogen rolle, og ulik antibiotikafølsomhet¹⁷⁴.

Diagnostisk har *A. vaginae* vist seg som en nyttigere markør for BV enn *G. vaginalis*. Menard et al. oppnådde ved kombinasjon av qPCR for *A. vaginae* og *G. vaginalis* en sensitivitet på 95% og spesifisitet på 99% for å diagnostisere BV, definert ved Nugent >6¹⁶⁶. Det eksisterer også en kopling mellom *A. vaginae* og *G. vaginalis* i BV-assosiert biofilm, som meget vel kan være et crux til å forstå patogenesen og behandlingsresistensen ved tilstanden.

A. vaginae har blitt assosiert til tilbakevendende BV og metronidazolresistens. I en stor kohortestudie av Bradshaw et al. fant man tilbakefall etter metronidazolbehandling hos 83% av de med påvisbare mengder *A. vaginae*, mot 38% hos de med kun *G. vaginalis*¹⁷⁵. Ferris et al. oppnådde i en mindre studie utelukkende behandlingssvikt hos kvinner kolonisert med *A. vaginae*¹⁷⁶.

Eggerthella, Leptotrichia, Megasphaera

Eggerthella, som også tilhører *Actinobacteria*, ble første gang assosiert til BV av Tamrakar et al.¹⁴⁶, siden av Thies et al.¹⁴⁷ og Ling et al.²⁶ Den er ellers kjent som en intestinal bakterie med patogen potensiale, assosiert til ulcerøs kolitt og bakteriemi¹⁷⁷. *Leptotrichia/Sneathia* er en bakterie innen *Fusobacteria* som også produserer melkesyre. *Megasphaera* tilhører *Firmicutes*, samme phylum som *Lactobacillus spp*, og forekommer i type en og type to, som utgjør hver sine fylogenetiske clades. De produserer melkesyre, og forekommer antakelig utelukkende i skjedefloraen.¹⁷⁸

Prevotella

Prevotella tilhører *Bacteroidetes* og har vært assosiert til BV lenge, siden den er lett å dyrke. Den assosieres til BV i stort sett alle de molekylærbaserte studiene, men er også påvist i et meget høyt antall av kvinner med normal flora, skjønt i lavere konsentrasjoner. En in vitro studie av Pybus et al. på *Prevotella bivia* og *G. vaginalis* viste at *G. vaginalis* vokste hurtigere ved tilstedeværelse av *Prevotella bivia*, som forsynte den med ammonium, mens aminosyrer fra *G. vaginalis* stimulerte *P.*

bivia tilbake, slik at de fremmet hverandres vekst. Dette er muligens et av mange eksempel på hvordan BV-assosiert mikrober kan utfylle hverandre for å tilfredsstille metabolske behov og i fellesskap fremme den polymikrobielle tilstanden BV¹⁷⁹.

Mobiluncus spp.

Mobiluncus (curtisii og mulieris) er bakterier innen *Actinobacteria*. De sees som bøyde staver i gramfargede preparater, og siden de tidligere ble oppfattet som svært spesifikke for BV, inngår de derfor som et av kriteriene etter Nugent (0-2 poeng). *Mobiluncus spp.* påvises imidlertid sjelden og i lave titere i studiene på skjedens mikrobiota som har tatt i bruk uselektiv PCR, også i BV-gruppen, cf Oakley et al. (<3%)¹⁵⁰ og Ling et al.²⁶ De forekommer også, men i lave titere, hos kvinner i clusterene med *Lactobacillus*-fattig flora i studiene til Zhou et al.¹⁴⁸ og Ravel et al.¹⁵⁷. Med taxonrettet PCR fant Schwebke et al. imidlertid en oppsiktsvekkende høy prevalens, hos 6/16 BV⁻ og 58/74 BV⁺¹⁸⁰. *M. curtisii* ble vist å være mest BV-spesifikk, og sensitivitet ved mikroskopi ble angitt til 47% for de med BV, men 0% for de uten. Zozaya-Hinchliffe et al. fant derimot prevalenser på 38% mot 75% for *M. curtisii* og 15% mot 81% for *M. mulieris* hos hhv. BV⁻ og BV⁺ afroamerikanske kvinner¹⁵⁸. Det er uvisst hva som kan være årsaken til denne uventede forskjellen i prevalenstall; om det er skjev seleksjon, om de spesifikke primerne overrapporterer eller om de universelle primerne underrapporterer *Mobiluncus spp.* Det er imidlertid vanskelig å komme opp med noen gode argumenter for å skille BV med eller uten tilstedeværelse av *Mobiluncus spp.* *M. curtisii* har på den annen side vist seg å være metronidazol-resistent¹⁸¹, og i en forholdsvis ny studie, hvor prevalensen av *Mobiluncus spp.* hos BV⁺ for øvrig ble målt til 100/594 med taxonrettet PCR, ble det vist en kopling mellom *Mobiluncus spp.* og behandlingsresistent BV¹⁸². Studien er imidlertid noe metodisk svak. De så på hvor mange av i utgangspunktet *Mobiluncus*-positive BV-tilfeller som fikk tilbakefall etter behandling (NS>6), og som da fortsatt var positive for *Mobiluncus* med PCR. Dette var 38/56 mot 5/44; tilstedeværelse av *Mobiluncus* er et Nugent-kriterium og en markør for BV, og det blir derfor en form for sirkelargumentasjon. Det skulle vært mer interessant å se om *Mobiluncus*-positive og -negative BV-tilfeller har ulik prognose. *Mobiluncus curtisii* er i alle fall den eneste av de BV-assosierte bakteriene som i studien til Zozaya-Hinchliffe et al. ble vist å ikke ha statistisk signifikant forskjell i N-gruppen og BV-gruppen, heller ikke ved en definert konsentrasjons terskelverdi ($p=.45$)¹⁵⁸. Det er grunn til å anta at *Mobiluncus spp.* har vært en tidligere avsporing i BV-forskningen, og kanskje ikke lenger er et relevant fokus.

BV-assosierte bakterier som redskap for BV-diagnostikk og -monitorering

De molekylærbaserte studiene har de siste årene kastet lys over mangelfullheten ved BV diagnostisert med mikroskopi, og har vist at molekylærbasert teknikk for kvantifisering av kritiske bakterier med terskelverdier for konsentrasjon vil måtte erstatte gammel diagnostikk. En interessant studie av Marazzo et al. på lesbiske kvinner illustrerer nettopp nytten av å ta i bruk den nye diagnostikken¹⁸³. De viste at påvisning av BVAB 1, 2 og 3 (RR=6, 18 og 13), *Atopobium* (RR=4), *G. vaginalis* (RR=4), *Leptotrichia* (RR=9) og *Megasphaera* (RR=12) i BV-negative kvinner kunne forutsi påfølgende BV, noe som kan antyde at forandringer i skjedens mikrobiota forutgår BV med uker eller måneder. BV var i samme studie også assosiert med ny partner, og spesifikke seksualpraksiser, særlig reseptiv oralsex (med et dose-respons-forhold), samt første del av menstruasjonssyklus. Hvis man kan identifisere abnormal flora tidligere, kan dette kanskje brukes for tidligere intervensjon og preventiv atferd, med særlig relevans for gravide kvinner. Fredricks et al. beskrev i en annen studie med bruk av kvantitativ PCR på lesbiske kvinner, endringen i bakteriekonsentrasjoner før og etter metronida-

zolebehandling.¹⁸⁴ De viste statistisk signifikante forskjeller for BV-assosierte bakterier mellom kvinner som fikk tilbakefall av BV og kvinner som var kurert en måned etter behandling, med størst konsentrasjonsforskjell for *G. vaginalis* og *A. vaginae*. Bakteriene ble derimot ikke utryddet i noen av gruppene. Vi trenger flere studier som monitorerer behandlingsresultat over lengre tid med qPCR.

Epidemiologi og transmissibilitet av abnormal vaginal flora

Epidemiologi og transmissibilitet

Forekomsten av BV anslås å ligge på mellom 8 og 23%¹⁰¹, men siden de fleste studier på BV har rekruttert pasienter i spesialiserte poliklinikker og STI-klinikker, må vi ha in mente at det oftest foreligger en systematisk seleksjonsbias. I tillegg kommer at ulike diagnostiske definisjoner er i bruk i ulike studier, og at det ennå ikke er konsensus om hvorvidt asymptomatisk *Lactobacillus*-fattig flora skal høre under BV-begrepet eller ikke. Hva vi vet, er imidlertid at BV er en svært vanlig tilstand, men med varierende prevalens mellom forskjellige områder og populasjoner. Blant de få samfunnsbaserte studiene, er de toneangivende studiene til Allsworth og Peipert¹⁸⁵ og Koumans et al¹⁸⁶, som bygger på data fra The US National Health and Nutrition Examination Survey, samlet mellom 2001-2004. De fant en samlet prevalens på 29% blant nesten 4000 kvinner mellom 14 og 49 år. Sosiodemografiske korrelasjoner inkluderte alder, etnisitet, fattigdom, lav utdanning og skjedeskylling (douching). Skjedeskylling skiller seg ut idet det utgjør en selvvalgt og bevisst praksis, feilaktig antatt som en naturlig del av god kvinnehigiene. Skjedeskylling er en veletablert og viktig risikofaktor for utvikling av BV, med $RR=1.2-5.1$ ¹⁸⁷, samt også en selvstendig risikofaktor for infeksjoner og flere svangerskapskomplikasjoner. Uheldigvis er det et svært hyppig forekommende fenomen i USA. 32% av amerikanske kvinner rapporterer skjedeskylling i løpet av de siste 12 måneder, og det er dobbelt så vanlig blant afroamerikanske som blant hvite amerikanere. Cottrell konkluderer med at helsearbeidere bør registrere og advare mot skjedeskylling i møte med kvinner som kommer for familieplanlegging, STI og i svangerskapskontroller.

Observasjonelle epidemiologiske studier av BV antyder en STI-lik profil. Seksuell aktivitet spiller en rolle både for insidens og alvorlighetsgrad av BV, og for sannsynligheten for tilbakefall¹⁸⁸. Etablerte risikofaktorer er partnerskifte eller mange tidligere partnere, med $RR=1.6$ for skifte til ny mannlig og $RR=2.0$ for skifte til ny kvinnelig partner, ung alder ved samleiedebut og manglende bruk av kondom, med $RR=0.8$ ¹⁸⁹. Siden den mikrobiologiske etiologien bak BV ikke er forstått, er det ikke enighet om hvordan disse faktorene disponerer for BV, men seksuelt overførte agens er generelt antatt å være involvert.

Studier på BV-assosierte bakteriers forekomst, fremfor alt *Gardnerella vaginalis*, hos kvinner og menn, og deres smittepotensiale skriver seg tilbake til 1950-tallet, fra studiene til Gardner og Duke¹⁹⁰, som isolerte *Gardnerella vaginalis* fra uretra hos 45 av 47 mannlige partnere av kvinner med BV. Videre demonstrerte de tydelig transmissibiliteten av BV, idet de lyktes i å indusere BV hos 11 av 15 kvinner ved inokulasjon av BV-skjedeseekret, og hos én av 13 ved inokulasjon av renfremstilt *Gardnerella vaginalis*¹⁹¹. Det siste var også et tydelig indisium for at *Gardnerella vaginalis* ikke alene kunne være årsak til tilstanden. I lys av deres funn, er det heller ikke overraskende at forekomsten av BV i gruppen kvinner som har sex med kvinner (KSK) har vist seg spesielt høy, 25-52%^{185,192}, og at det er en meget sterk konkordans av BV mellom KSK i monogame forhold, 73-95%^{192,193}. Marazzo et al.

har gjort en tverrsnittsstudie med selvintervju for å avdekke ulike atferdsmarkører assosiert til overføring av tilstanden mellom KSK, og fant at seksualpraksis som effektivt overfører skjedeseekret, slik som deling av sex-leketøy, samt bruk av lubrikanter var assosiert¹⁹⁴.

Når det gjelder kolonisering av menn, og hvorvidt de utgjør et reservoar for bakterier forbundet med BV, som overføres seksuelt, har litteraturen lenge vært sprikende. Prevalenstillene ved isolasjon av *G. vaginalis* hos mannlige partnere av kvinner med BV har variert fra 30 til 95%¹⁹⁵. Dawson og Ison undersøkte 450 menn som besøkte en STI-klinikk og fant en prevalens på 11% blant menn generelt, med RR=3.2 for heteroseksualitet¹⁹⁶. Schwebke et al. fant derimot i en studie i 2008, ved deteksjon med PCR, en prevalens av *G. vaginalis* på 25%, uten signifikante forskjeller mellom mennene som var partnere av kvinner med eller uten BV¹⁹⁵. Studier av unge menn understøtter imidlertid seksuell transmisjon av BV-assosiert flora. I en studie av Nancy G. Wahl lot *G. vaginalis* seg ikke påvise ved dyrkning verken fra uretra eller rectum hos 99 gutter som var mellom 1 måned og 7 år gamle¹⁹⁷ og i en studie av Kumar et al. ble *G. vaginalis* kun påvist i uretra hos en av 50 ungdommer, og ikke hos noen blant 50 nylig gifte unge menn uten forhistorie for STI¹⁹⁸. E. Holst utførte imidlertid en betydningsfull studie i 1990, hvor hun så på et utvidet spekter av BV-assosierte bakterier: *Mobiluncus mulieris* og *curtisii*, *Mycoplasma hominis* og *G. vaginalis* i genitale, rektale og orale/faryngeale prøver¹⁹⁹. Hun påviste rektal bærertilstand av alle fire organismer både hos voksne og hos barn og hos begge kjønn. Av de 13 mannlige partnerne av kvinner med BV, som også var kolonisert med en av disse bakteriene, var kun en fremdeles positiv i genitalia etter to ukers kondombruk, mens det ikke var en tilsvarende påvisbar nedgang i rektal bærertilstand. Hun konkluderte med at disse bakteriene altså kun påvises forbigående i genitalia hos menn, og at de ikke utgjør noe reservoar eller noen kilde for heteroseksuell smitte. Verstraelen har bygget videre på disse argumentene og postulert at BV nok *intensiveres* og *fremmes* av seksuell aktivitet mellom kvinner og menn, men ikke *overføres* seksuelt^{188,200}. En sentral innvending mot disse studiene er at de fokuserer på enkeltbakterier ved en polymikrobiell tilstand, hvis etiologi ennå ikke er forstått. De har heller ikke sett på ulike biotyper av *G. vaginalis* med mulig ulik evne til patogenisitet¹⁶⁷. Vi må i alle fall anta at kvinner representerer et reservoar av BV-assosierte bakterier med potensielt lengre infektivitetsvindu enn menn.

To studier har vurdert og sammenliknet forekomst av BV hos unge kvinner som ikke har debutert seksuelt opp mot seksuelt aktive^{201,202}. Selv om disse studiene konkluderer med at BV forekommer like hyppig hos jenter som ikke har debutert, har de hatt liten gjennomslagskraft, siden de er beheftet med metodologiske svakheter, slik som at deltakerne selv rapporterer og definerer virginitet, uten at det sies noe om f.eks. oralsex, petting, eller homoseksuell erfaring, cf. Tabrizi et al. som fant at ikke-penetrativ seksuell kontakt er assosiert med kolonisering med *Gardnerella vaginalis* og *Atopobium vaginae* hos unge kvinner²⁰³. I tillegg fremviser den ene studien oppsiktsvekkende resultater som ikke er verifisert noe annet sted, idet 88% av de med påvist BV ved første kontroll viste seg å bli spontant kurert. I klinisk praksis hører BV hos ikke seksuelt aktive kvinner til sjeldenhetene, selv om det beskrives anekdotisk i litteraturen²⁰⁴. En studie av Douglas L et al. har sett på forekomsten av *Gardnerella vaginalis* hos 137 seksuelt misbrukte barn sammenliknet med 119 barn uten forhistorie for misbruk, og fant en RR = 3.5, og en ennå sterkere assosiasjon der hvor barna var blitt utsatt for gjentatte overgrep²⁰⁵. BV ble ikke påvist hos noen av barna. I en studie av Hammer-schlag et al. fant man imidlertid BV hos 8 av 31 overgrepsutsatte, hvorav fem før menarke²⁰⁶. Påvis-

ning av BV og isolasjon av *Gardnerella vaginalis* hos barn må følgelig tas som et varsel om muligheten for seksuelt misbruk.

Selv om epidemiologien ved BV altså sterkt antyder et mannlig bidrag og et mulig mannlig bakteriereservoar, har studier på partnerbehandling imidlertid vist lite lovende resultater og ikke tilsvarende kunnet understøtte antatt seksuell transmisjon. Det er gjort i alt 6 studier på partnerbehandling, alle med éndoseregimer av klindamycin eller metronidazol^{207,208,209,210,211,212}, oppsummert i en grundig artikkel av J Potter fra 1999²¹³. Kun Mengel et al. har oppnådd signifikante resultater i favør av partnerbehandling, og da i form av lavere andel BV-positive kvinner etter 2 uker, men ikke etter 8 uker²¹⁰. Studien er videre beheftet med metodologiske svakheter, ikke minst høyt frafall både blant kvinner og partnere og sammenblanding av diagnostisk metode med først klinisk og så gramfarget mikroskopisk diagnose. Etter 1997 er det ikke gjort nye studier på partnerbehandling. Det er viktig å merke seg at dette først og fremst er studier på hvorvidt partnerbehandling vil redusere andelen behandlingsresistente tilfeller av BV, og det er ikke usannsynlig at terapiregimene som viser seg inadekvate for kvinnene, også er det for mennene (se under). Man kan ikke trekke konklusjoner om hvorvidt menn kan ha utgjort en smittekilde for kvinner. Vi vet ikke om utryddelse av spesifikke BV-assosierte bakterier hos mannlige bærere ville redusert sannsynligheten for at deres fremtidige partnere skulle utvikle BV. Det kan som antydnet og tenkes at éndoseregimene som ble brukt, er inadekvate for å eliminere bakteriene hos menn, og at kvinnen og mannen ved gjentatt eksposisjon under behandlingen kan ha bidratt til resistens, slik at en mulig partnereffekt drukner. Ingen av studiene har f.eks. vurdert effekt av seksuell avholdenhet/kondombruk under behandling. Forekomst av BV-assosierte bakterier hos mennene før og etter behandling er heller ikke studert. Hvilken rolle seksuelt overførte bakterier spiller, og hvorvidt det eksisterer en eventuell gevinst av partnerbehandling bør derfor fremdeles betraktes som uavklarte spørsmål.

Biofilm og kohesiv *Gardnerella vaginalis*

En ytterligere komplikasjon til bildet kom med den nye kunnskapen om biofilmdannelse hos kohesive underarter av *Gardnerella vaginalis*. Biofilm er en koloniserings- og vekstform, hvor bakteriene aggregerer til hverandre i et organisert fellesskap innenfor en selvprodusert polymerisk matriks, hvorved de oppnår sterk adheranse til overflaten de koloniserer, unngår vertens immunforsvar og blir mindre tilgjengelig for antibiotika. Det motsatte er planktonisk vekst, hvor bakteriene vokser spredt i mindre kolonier. Swidsinski et al. var de første til å beskrive dette fenomenet i skjeden hos kvinner med BV i 2005.¹⁶⁸ De mikroskoperte in situ fluorescensmerkede biopsier fra 20 kvinner med BV og 20 friske pre- og 20 friske postmenopausale kvinner. Senere har de samme forfatterne gått videre med mikroskopi av utstryk fra uretra hos menn og urinsedimenter fra kvinner og deres partnere, og demonstrert tydelig både en mannlig bærertilstand og en konsekvent parkonkordans av kohesiv *G. vaginalis*²¹⁴. Alle studier som har vurdert biofilm i relasjon til bakteriell vaginose og kohesiv *G. vaginalis* over de siste seks årene er oppsummert under i tabell 2.

Tabell 2.

Studier som har vurdert biofilm i relasjon til bakteriell vaginose

Studie	År	Populasjon	Metode	Hovedfunn
†1. Swidsinski et al. ¹⁶⁸	2005	Tyskland 20 BV ⁺ 20 preMP, 20postMP friske kontroller, vurdert etter Amsel	Dyrkning. Biopsier til FISH, 36 gruppe og species- spesifikke prober. Mikroskopisk vurdering av disse bakterienes adhesjon til skjedeepitelet	<i>G. vaginalis</i> funnet hos 19/20 BV ⁺ og hos 5/40 kontroller. Høye titere (>10 ⁵ cfu/ml) kun hos BV ⁺ (80%). Ingen biofilm hos 14/20 preMP og 6/20 postMP friske. En løs biofilm ble sett hos 5/20 preMP og 11/20 postMP, hovedsakelig bestående av <i>Lactobacilli</i> . En tett biofilm, som dekket >50% av skjedeepitelet ble sett hos de resterende 10% friske, og hos 90% av de BV ⁺ . <i>G.</i> <i>vaginalis</i> utgjorde 60-95% av biofilmmassen, og <i>A. vaginae</i> var homogent innblandet i 70%, utgjørende 1-40% av biofilmmassen. De fire friske med tett biofilm hadde Nugent score 4-6, og de to BV ⁺ uten tett biofilm hadde VVC.
2. Saunders et al. ²¹⁵	2007	Canada	In vitro modell av <i>G.</i> <i>vaginalis</i> biofilm utsatt for ulike <i>Lactobacillus</i> - kulturer. Mikroskop og dataanalyse.	Store deler av <i>G. vaginalis</i> biofilmen ble uthulet og erstattet med <i>Lactobacilli</i> . Dette gjaldt alle <i>Lactobacillus spp.</i> , og spesielt den lite H ₂ O ₂ -produserende <i>L. reuteri</i> . <i>L. iners</i> var i stand til å fortrenge <i>G. vaginalis</i> og danne en egen biofilm i dens sted.
3. Patterson et al. ²¹⁶	2007	USA	In vitro modell av <i>G.</i> <i>vaginalis</i> biofilm og planktoniske kulturer utsatt for H ₂ O ₂ og melkesyre	Biofilmer tålte 5 ganger så høye konsentrasjoner av H ₂ O ₂ og 4-8 ganger så høye konsentrasjoner av melkesyre som planktoniske kulturer. Proteolytisk oppløsning av biofilmen økte sårbarheten for H ₂ O ₂ og melkesyre.
†4. Swidsinski et al. ²¹⁷	2008	Tyskland 18 BV ⁺ kvinner (Amsel og Nugent) behandlet 1 uke med 2x500mg metronidazol peroralt Fulgt i 5 uker.	Biopsi fra tre av kvinnene ved hver uke (0-5). FISH med prober for <i>G. vag.</i> , <i>A. vag.</i> og en rekke andre bakterier	Initial respons i skjedens pH (fra 5.5 til 4.5) og NS (fra 6 til 2), samt bakterietetthet og biofilmtetthet fra 1 til 2 uker etter behandling. Så økning i pH (4.8) og NS (4), samt formidabel økning i biofilmtetthet og svak økning i bakterietetthet fram til 5 uker etter behandling. <i>G. vag.</i> i alle biopsiene, <i>A.</i> <i>vag.</i> i halvparten (utgjorde 5-40%).
†5. Swidsinski et al. ²¹⁸	2010	Tyskland 20 tilfeldige prøver av nedfrosset donorsæd	FISH ved tilsetning av tre GV-spesifikke prober i sentrifugerte donorsædprøver	Bakterier ble ikke påvist annet enn festet til epitel. Intakte epitelceller ble påvist i 18/20 prøver. En klebrig <i>G. vag.</i> -biofilm ble funnet i tre av disse (17%). Forfatterne konkluderer med at <i>G. vag.</i> -biofilm-screening bør utføres på urin- og sædprøver før donasjon.
†6. Harwich et al. ¹⁷¹	2010	USA Gensekvensering av <i>G.</i> <i>vaginalis</i> 5-1 (fra BV ⁻ kvinne) og AMD (fra BV ⁺ kvinne)	Helgenoms 454 pyrosekvensering - Elektronmikroskopi - Dyrkning og innføring i brønner med skjedeepitel	Sekvenseringen avdekket flere mulige gener for virulensfaktorer, inklusive adhesiner, pili og toxin-antitoxin. Den BV-assosierte AMD kodet en annen variant av et gen assosiert til biofilmprotein enn 5-1, og viste høyere adheranse, aggregasjon og biofilmdannelse. Direkte kontakt med skjedeepitel var nødvendig for cytolysis.

†7. Patterson et al. ¹⁷⁰	2010	USA 11 ulike subarter av BV-assosierte anaerobes, inklusive <i>G. vaginalis</i> og <i>A. vaginae</i>	In vitro modell for biofilmdannelse, adheranse til skjedeepitel og cytolysis	<i>G. vaginalis</i> dannet tykkere og mer klebrig biofilm enn <i>F. nucleatum</i> , som var den eneste andre biofilmdannende anaeroben. <i>G. vaginalis</i> og <i>Peptoniphilus</i> viste sterk adheranse, <i>A. vaginae</i> moderat, og de andre anaerobene liten eller ingen. Kun <i>G. vaginalis</i> var i stand til å indusere cytolysis.
†8. Swidsinski et al. ²¹⁹	2010	Tyskland 20 BV ⁺ kvinner (Amsel og Nugent) behandlet 5 dager med 1x400mg moxifloxacin peroralt. Fulgt i 12 uker.	Biopsi med FISH FISH i sedimenter av sentrifugert urin. Spesifikke prøber for <i>G. vag.</i> , <i>A. vag.</i> og <i>Lactobacilli</i>	75% forble symptomfrie etter behandling. pH og Nugent score forble samlet signifikant lavere under behandlingsperioden. Kohesiv <i>G. vag.</i> sank til 25% etter 2 uker for så å stige igjen til 40% etter 12 uker. Andelen kvinner med påvisbar <i>A. vaginae</i> sank fra 70% til 15%, og konsentrasjonen av <i>Lactobacilli</i> steg signifikant fra 9% til 32% av floraen.
†9. Swidsinski et al. ²¹⁴	2010	Tyskland Urinprøve fra 20 symptomatiske BV ⁺ -kvinner (etter Amsel), 10 av deres partnere, 250 kontroller (tilfeldig inneliggende pas) - Urinprøve fra 72 gifte gravide og alle deres partnere - To BV ⁺ -kvinner og 20 kontroller avga daglig urinprøve i 4 uker	Biopsi med FISH FISH ved tilsetning av tre <i>G. Vag.</i> -spesifikke prøber i sentrifugert urin	I BV ⁺ -gruppen, inklusive partnere ble kohesiv <i>G. vag.</i> påvist i alle prøver. I kontrollgruppen forekom kohesiv <i>G. vag</i> hos 13% av kvinnene og 7% av mennene, men ikke hos jentebarna (4-10 år, n=50). Planktonisk <i>G. vag</i> ble funnet hos 10-18% av kvinner, hos 3-5% av menn, samt hos 10% av barna og oppviste ingen parkonkordans. - 16% av de gravide hadde kohesiv <i>G. vag</i> , deres partnere hadde enten kohesiv <i>G. vag.</i> (67%) eller ikke analyserbare prøver (33%). - Ved daglige longitudinelle observasjoner over 4 uker ble transisjon mellom kohesiv og spredt <i>G. vag.</i> (og vice versa) aldri observert.

Behandlingsstudiene har ikke vurdert eller behandlet partner, eller gitt råd om seksuell avholdenhet i behandlingsperioden.

Diskusjon

Med biofilmooppdagelsene til Swidsinski et al. for seks år siden har troen på en enklere forklaringsmodell for patogenesen til BV og veien til mer funksjonell behandling fått en ny renessanse. Imidlertid kan det synes som deres oppdagelser har fått ufortjent liten gjennomslagskraft. Studiene på BV-biofilm har vært relativt få, med et lite klinisk og epidemiologisk fokus, og har vært konsentrert innen mindre forskerfellesskap i Tyskland og USA.

In vitro-studiene til Patterson et al.^{170,216} og gensekvenseringsstudien til Harwich et al.¹⁷¹ har innledet prosessen med å beskrive den molekylære og genetiske basis for *G. vaginalis'* virulens. *G. vaginalis* synes de andre BV-assosierte bakteriene overlegen, hva gjelder evne til biofilmdannelse, adheranse til skjedeepitel og cytotoxitet. Produksjonen av vaginolysin er antakelig, som tidligere nevnt, sentralt for lysis av erytrocytter og tilgang på jern under menstruasjon. Dette er et essensielt næringssubstrat og en mulig vekstfaktor. Harwich et al. identifiserte også en toxin-antitoxin boks, som kan være viktig for *G. vaginalis'* evne til å konkurrere ut andre bakterier og fremme seg selv¹⁷¹. *G. vaginalis* fra BV-fluor kodet også for et annet biofilmgen enn *G. vaginalis* fra normal fluor. Det ser altså ut til at det ikke er tale om aktivering og inaktivisering av identiske gener og fenotypiske skift hos

G. vaginalis, men at forskjellige subspecies koder for ulike gener, og dermed oppviser ulik sykdomsfremkallende evne. Det er ikke urimelig å tro at disse subspecies kan være de seksuelt overførte agens som er ansvarlig for BVs STI-profil, og Swidsinski et al. har foreslått å gi disse navnet *Gardnerella genitalis*²¹⁴.

Når BV oppstår, ser vi en oppvekst av visse anaerobe bakterier, som antakelig forsyner hverandre med næringssubstrater og fremmer hverandres vekst, e.g. ammonium og aminosyrer mellom *Prevotella* og *G. vaginalis*¹⁷⁹. Det kan tenkes at kohesiv *G. vaginalis* er den første kolonidanneren, som aggregerer til skjedefpitelet og danner biofilm⁴⁹. Dette kan igjen muligens indusere et faseskift hos de andre anaerobene, som festes til biofilmen. Sensitiv taxonrettet PCR har vist at de BV-assosierte mikrobene antakelig er en del av skjedens normalflora, men i små antall og vanligvis sterkt undertrykt av de dominerende *Lactobacillus spp.* Særlig *A. vaginae* ser ut til å finnes i biofilmen, og dens relevans er uavklart, selv om det er antatt at den kan ha en rolle i metronidazolresistens. Dens tilstedeværelse er imidlertid på ingen måte noen absolutt forutsetning.

BV behandles i dag med metronidazol eller klindamycin som fortrinnsvis har et anaerobt spekter. Denne behandlingen fører til et initialt fall i konsentrasjonen av de kjente BV-assosierede anaerobene, som antakelig er avhengige av hverandre for optimal vekst, og det sees et skifte i skjedefloraen^{12,132,184}. *Lactobacilli* er derimot ikke følsomme for metronidazol, og når det innstilles en ny flora, overtar de dominansen ved vellykket behandlingsresultat. Swidsinski et al. viste at til tross for klinisk respons og tilbakegang i biofilmtetthet, var standard antibiotikabehandling med metronidazol ikke tilstrekkelig for å fjerne biofilmen²¹⁷, og man er åpenbart avhengig av en vel fungerende vertsrespons i tillegg for å fortrenge de kohesive *G. vaginalis* helt. Moxifloxacin oppviste en betydelig kraftigere mikrobiologisk effekt, men biofilm var fortsatt til stede hos 40% etter 12 uker²¹⁹. De har dessverre et meget høyt frafall i studien, hvilket svekker tallfestingen av funnene betraktelig, men de kvinnene som hadde biofilm ved to ukers kontroll (3/12), hadde det også ved 12 uker (2/6), og biofilmen ble trolig aldri fullstendig fjernet. Det skulle vært interessant å vite om det var noen forskjell i mikrobiologisk profil hos de med vellykket og feilslått behandling. Reduksjon i biofilmen ved hjelp av FISH-analyse må være et naturlig kriterium for måling av behandlingseffekt i studier av BV-behandling fremover.

Swidsinski et al. har utviklet en svært lite invasiv og god teknikk for påvisning av kohesiv *G. vaginalis* med FISH av urinsedimenter. Dette gjør det mulig å overvåke mikrobiologiske endringer longitudinelt under og etter behandling av kvinne og partner. Den sterke konkordansen av kohesiv *G. vaginalis* mellom par indikerer for øvrig at infeksjonen ikke utelukkende kan tilskrives inadekvat normalflora eller forhold hos verten²¹⁴. Da skulle man ikke forvente å finne bakterien så hyppig hos partneren. I BV-gruppen ble kohesiv *G. vaginalis* påvist i samtlige prøver hos både kvinnene (n=20) og deres partnere (n=10), og partnerne til de gravide kvinnene som fikk påvist kohesiv *G. vaginalis*, hadde alle enten kohesiv *G. vaginalis* (n=8) eller ikke analyserbare prøver (n=4). Derimot ble kohesiv *G. vaginalis* ikke påvist hos noen av partnerne til gravide kvinner uten kohesiv *G. vaginalis* (n=60). Disse gravide kvinnene var tilfeldig utplukkede og 40% (n=5) var asymptomatiske. Denne samsvarigheten i påvisning av biofilmdannende *G. vaginalis* er påfallende, og disse funnene kan ikke ignoreres i framtidig BV-forskning. På den annen side er det noen kvinner som blir diagnostisert med BV etter Nugent i samme studie, men som ikke oppviser kohesiv *G. vaginalis* (n=5/53). Disse er for øvrig alle asymptomatiske. Kanskje har disse kvinnene et naturlig, vertsavhengig fravær av *Lactobacillus*-

dominans, og ikke på grunn av at skjedeveggen er kledd med *G. vaginalis* biofilm. Det kan være at disse kvinnene har en funksjonell, *Lactobacillus*-fattig flora som ikke fremmes av en seksuelt overført biofilm, lik den vi ser så hyppig hos afro- og latinamerikanske kvinner. Det skulle være svært interessant å vite om disse kvinnene også vil være negative for clue-celler etter Amsels kriteria.

Det kan også se ut til at prevalensen av kohesiv *G. vaginalis* er høyere hos kvinner enn menn, hhv. 13% og 7%. Dette understøtter den tidligere formulerte hypotesen om at kvinner har lengre infektivitetsvindu enn menn. En svakhet ved studien er imidlertid at de ikke konsekvent oppgir antallet ikke-analyserbare prøver i de ulike gruppene. Der hvor det oppgis, er det påfallende høyt for menn (for eksempel 4 av 12 partnere av gravide kvinner med kohesiv *G. vaginalis*). Kanskje har menn like høy prevalens, men FISH av urinsedimenter har lavere sensitivitet hos dem. Dette må avklares for å validere fremgangsmåten for påvisning hos begge kjønn. Noen av prøvene fra mennene (18%) inneholdt få (<5) epitelceller, og forfatterne demonstrerte også betydningen av at forhuden dekker glans under avgivelse av urinprøve. 65% av prøvene til mennene som ble bedt om å trekke forhuden tilbake under vannlatningen var ikke analyserbare. Det må derfor undersøkes om det finnes mer hensiktsmessige måter for å få representative prøver fra menn, for eksempel vattprøve fra uretra eller sulcus coronarius.

Konklusjon og perspektiver

Med molekylærbaserte teknikker for identifisering og kvantifisering av nye og til nå udyrkede bakteriearter, og spesielt gjennom de dyptpløyende, høyprosesserende pyrosekvenseringsstudiene har vår forståelse av bakteriesammensetningen i kvinnens skjede de siste tolv årene vært gjenstand for en total revisjon. I tråd med tidligere oppfatning er det vist at majoriteten har en skjedeflora totaldominert av en eller høyst to eller tre dominerende *Lactobacillus* spp. fra en gruppe på fire hovedspecies, *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri* og *L. iners*, men med betydelig variasjon mellom ulike etniske grupper i hvor stor prosentandel som er dominert av hvilken hovedspecies. Hvilken *Lactobacillus* sp som dominerer, er antakelig bestemmende for skjedens bakteriestabilitet. En flora dominert av *L. crispatus* eller *L. jensenii* er generelt de mest stabile, og forekommer hyppigst hos hvite og japanske kvinner. *L. iners* er i en særstilling, ettersom den kan eksistere side om side med en ellers utjevnet, rik bakterieflora. Ut over dette finner vi også en stor andel kvinner, som ikke opplever plager, men som har en flora uten *Lactobacillus*-dominans. I deres flora er det en relativ utjevning i bakteriekonsentrasjon, og andre melkesyreproduserende bakterier forekommer i relativ overhyppighet, primært *A. vaginae*, *Megasphaera* og *Leptotrichia*.

Ved ytterligere genotypisk fininndeling finner vi på den annen side at de dominerende artene av *Lactobacilli*, oftest kan inndeles i et titalls subspecies med små genetiske ulikheter. De er imidlertid ikke bare av akademisk interesse da disse ulikhetene også kan manifestere seg fenotypisk. Under overflaten, som hos majoriteten altså er totaldominert av *Lactobacillus* spp., finner vi videre med sensitiv molekylærbasert teknikk de samme bakterieartene som sees ved utjevnet, blandet flora, og som sees ved skjedefloraforstyrrelsene intermediær flora og BV ved Nugents kriteria. Den interindividuelle variasjonen i fylotyper er også enorm, både mellom kvinner med frisk og kvinner med blandet eller syk bakterieflora. Kvinner med forstyrret flora har imidlertid samlet sett betraktelig høyere variasjon enn kvinner med *Lactobacillus*-dominans.

Muligens står vi overfor et paradigmeskifte og en total revisjon av hele BV-begrepet, som i dag hemmes av en utilfredsstillende mikroskoperingsdiagnose som ikke er kompatibel med moderne mikrobiologisk teknikk. Vår forståelse av BV bygger også på inkonsistente, epidemiologiske studier som har avdekket korrelasjoner mellom BV-assosierte bakterier og sykdom, uten at dette har kunnet utdype vår kausale forståelse. Ikke minst er det sterke indisier for at komplikasjonene knyttet til tilstanden kanskje må koples til bakterieunderarter med særlige patogene trekk, som ikke kommer fram ved klassisk taksonomisk bakterieinndeling. Kanskje overlapper BV diagnostisert ved Nugents kriteria kun delvis med de tilstandene som er klinisk og medisinsk viktige, og kanskje er denne diagnostikken særlig tilpasset hvite kvinner. Mens en *Lactobacillus*-fattig flora hos hvite kvinner vil være sterkt korrelert til tilstedeværelse av en patogen, biofilmdannende *G. vaginalis*, er kanskje denne sammenhengen svakere hos afrikanske og afro- og latinamerikansk kvinner, hvor en slik flora ser ut til å måtte være en normalt tilstand. Det er et sentralt poeng at Nugents kriteria ble utviklet og validert i en hvit befolkning.

Spesifisiteten for Amsels og Nugents kriteria opp mot mikroskopisk diagnose av biofilm med FISH i ulike populasjoner må avklares. Genene som er involvert i biofilmdannelse må deretter identifiseres for at utvikling av spesifikk PCR for de underartene av *G. vaginalis* og *A. vaginae* som utgjør den patogenetiske kjernen i tilstanden kan utvikles. Kanskje er clue-celler en spesifikk indikator for tilstedeværelse av biofilm, og BV-diagnosikk etter Amsel er antakelig mer anvendelig enn Nugent og Ison&Hay. Oppdagelsen av biofilmen var et formidabelt gjennombrudd i BV-forskningen, og gode teknikker for påvisning av biofilmdannende *G. vaginalis* må finnes og tas i bruk også i epidemiologiske studier. Inntil videre må overvåkning av mikrobiologisk respons i behandlingsstudier utføres med FISH. Ifølge Swidsinski et al. er dette ikke vanskeligere eller dyrere enn mikroskopisk diagnose etter Nugent, hvis man har anskaffet et FISH-mikroskop²¹⁴. Vi må så spesielt få avklart hvilken rolle blandet, *Lactobacillus*-fattig flora har. Kvinner med Nugentscore >3, men uten samtidig kohesiv *G. vaginalis* utgjør kanskje en egen gruppe, med en funksjonell flora, hvor skjedens intrinsiske forsvar mot infeksjon og svangerskapskomplikasjoner opprettholdes av andre melkesyreproduserende bakterier. Hvis det derimot viser seg at andelen kvinner med en asymptomatisk, ikke-funksjonell dysbiose er høyere hos afrikanske kvinner, grunnet f.eks genetiske eller dietetiske vertsfaktorer, eller mikrobiologisk miljø, og at dette bidrar til den økte forekomsten av STI generelt og HIV spesielt, samt obstetrisk dårligere prognose, er imidlertid tiltak for å identifisere og rette opp skjedefloraen i denne gruppen en meget stor og viktig global utfordring.

Hvilken kopling som finnes mellom *G. vaginalis* og andre bakterier i biofilmen, særlig *A. vaginae* må avdekkes, og hvilke underarter av de BV-assosierte bakteriene som uttrykker virulensfaktorer, som evne til biofilmadheranse, *quorum sensing*, synergistisk metabolisme og bidrag til antibiotikaresistens må utdypes. Swidinski et al. har vist at *Gardnerella* biofilm, selv om den kan undertrykkes midlertidig, på sikt er resistent mot både metronidazol og moxifloxacin i omkring halvparten av tilfellene. En ny studie på bruk av borsyre for nedbrytning av biofilmen og samtidig standard antibiotika for behandling av tilbakevendende BV har vist lovende resultater²²⁰, og in vitro studier på proteolyse av biofilmen har vist at dette øker sårbarheten for melkesyre og naturlige anti-mikrobielle substanser²¹⁶. Studier på spesifikke virkestoffer som kan bryte ned biofilmen, og gjøre bakteriene tilgjengelige for antibiotika og/eller probiotika, eventuelt tiltak for mekanisk rensing og fjerning av biofilmen²⁰⁴, må derfor være et naturlig fokus framover.

Det er behov for en enhetlig protokoll for inklusjons- og eksklusjonskriterier i studiene på BV, slik som menstruasjonssyklus, bruk av hormonell prevensjon, antibiotika og seksualatferd. Det må også foreligge en enhetlig framgangsmåte for henting av prøver til mikrobiologisk analyse, da skjeden kan inndeles i ytterligere definerte mikrorom med hver sine distinkte florasammensetninger, slik som fra midt i eller dypt i skjeden^{164,221}. Studier med gjentatte prøver fra samme kvinne er nødvendig for å avgjøre hva som er mest hensiktsmessig framgangsmåte, og innen hvilke tider i menstruasjonssyklus prøvene bør tas. Hvilke metoder for ekstraksjon av DNA som er hensiktsmessige, og hvilke primersett som skal brukes, må også være standardisert skal det være mulig å sammenlikne molekylærbaserte studier med uselektiv PCR. Det er selvfølgelig også helt avgjørende at det utvikles en omforent definisjon av BV. Swidsinski et al. har foreslått betegnelsen *gardnerellose* for BV med tilstedeværelse av *G. vaginalis* biofilm, og *Gardnerella genitalis* for kohesiv *G. vaginalis*²¹⁴.

Det er videre generelt et behov for longitudinale studier, som avdekker dynamikken i skjedefloraen og hvor bakteriene kommer fra, også med fokus på kvinner med asymptomatisk BV. Nå når intensive analyser med mange avlesninger har avdekket de sentrale artene i frisk og syk skjedeflora, er det hensiktsmessig med taxonrettet kvantitativ PCR som er sensitivt og effektivt, og kan si oss mye om variasjonen over tid. Da kan vi kanskje identifisere faktorer i miljøet som fremmer oppvekst av bakteriene med patogenetens potensiale. Samtidige rektale prøver kan være av viktig betydning²²². Analyser av asymptomatiske kvinner med mindre *Lactobacillus*-dominert flora, er nødvendig for å avklare om dette faktisk er en mindre funksjonell normalflora. qPCR er et ypperlig verktøy for å følge disse kvinnene. Vertsforhold, herunder diett og slik som vitamin D status²²³ og laktasemangel, og fremfor alt immunologiske faktorer²²⁴ bør også studeres.

Betydningen av de ulike underartene av *L. crispatus*, for utnyttelsespotensiale i probiotisk terapi, må avklares. Muligens er dette et blindspor, ettersom vi ikke vet hvilke vertsfaktorer som bevirker adhesjon av ulike *Lactobacillus spp.* I framtiden vil kanskje individualtilpasset terapi bli aktuelt. Hvilke *Lactobacillus spp.* som er i stand til å oppnå vedvarende kolonisering hos de med *Lactobacillus*-fattig flora er i så fall sentralt. Det er gjort lovende studier på østrogenbehandling sammen med probiotisk terapi, og østrogenholdige p-preparater er vist å være protektivt mot BV. Denne sammenhengen må utdypes med tanke på klinisk anvendelse.

Det er et utmerket rasjonale for probiotisk terapi, men dette har i klinisk praksis ikke kunnet oppvise resultater. Hvilke faktorer som fremmer evne til kolonisering hos ulike underarter av *Lactobacilli* må avklares, og hvilke vertsfaktorer som hindrer dette, spesielt under samtidig BV, må undersøkes. Hva som er hensiktsmessig administrasjonsform hører også med. Det er funnet at tilstedeværelse av *Lactobacilli* som også koloniserer rectum, og dermed kan utgjøre et rektalt reservoar, er protektivt¹²⁰, og kanskje inngår dette som et sentralt kriterium for vedvarende kolonisering ved probiotisk terapi. Laktobacillenes evne til å bekjempe biofilmdannende underarter av *G. vaginalis*, blandet med *A. vaginae* må også tas med i beregningen²¹⁵. På samme måte som at BV utgjør en polymikrobiell entitet, utgjør imidlertid også den friske skjedefloraen en polymikrobiell entitet, og ekso-gen tilførsel av en enkelt *Lactobacillus sp.* er kanskje ikke nok til alene å oppnå dominans over det anaerobe miljøet. De dyptgående pyrosekvenseringsstudiene har demonstrert at skjeden er kolonisert av et heterogent mangfold av subspecies innen *Lactobacilli* og *Lactobacilliales*.¹⁵⁷ I hvilken grad

disse utfyller og fremmer hverandre må derfor også muligens belyses for at vi skal komme fram til hensiktsmessig probiotisk behandling.

Partnerbehandling må igjen tas opp til vurdering. Swidsinski et al. har uomtvistelig demonstrert et mannlig reservoar for kohesiv *G. vaginalis*, og til og med tilstedeværelsen av biofilm i nedfrosset donorsæd. Dette kan ikke ignoreres. Det må avklares hvilken behandling som er effektiv for å utrydde bakterien hos menn, og om slik behandling skal gis. Seksuell avholdenhet/kondombruk under gjensidig behandling må antakelig etterstrebes for å hindre tilbakefall. Velorganiserte studier som ser på biofilmdannende *G. vaginalis* hos menn og med ulike behandlingsregimer er i alle fall påkrevd. Hvis det viser seg å eksistere en behandlingsbar mannlig bærertilstand, og dette kan påvises med moderne PCR-teknikk må det selvsagt vurderes om kohesiv *G. vaginalis* skal inngå i mannlig STI-screening på linje med *Chlamydia trachomatis*.

Etterord

Jeg vil rette en stor takk til prof. dr. Harald Moi, som har gitt meg behørig og kyndig veiledning og som har introdusert meg til oppgavetemaet.

Jeg vil også takke for nyttige innspill fra dr. Amir Moghaddam ved Først mikrobiologiske laboratorium.

Referanser

- ¹ Paavonen J. **Physiology and ecology of the vagina**. Scand J Infect Dis Suppl. 1983;40:31-5.
- ² Boskey ER, Cone RA, Whaley KJ, Moench TR. **Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source**. Hum Reprod. 2001 Sep;16(9):1809-13
- ³ Linhares IM, Summers PR, Larsen B, Giraldo PC, Witkin SS. **Contemporary perspectives on vaginal pH and lactobacilli**. Am J Obstet Gynecol. 2011 Feb;204(2):120.e1-5. Epub 2010 Sep 15
- ⁴ Hillier SL, Krohn MA, Rabe LK, Klebanoff SJ, Eschenbach DA. **The normal vaginal flora, H₂O₂-producing Lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women**. Clin Infect Dis. 1993 Jun;16 Suppl 4:S273-81
- ⁵ Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, Davis CC, Islam MR, Forney LJ. **Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods**. Microbiology. 2004 Aug;150(Pt 8):2565-73
- ⁶ Witkin SS, Linhares IM, Giraldo P. **Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation**. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2007 Jun;21(3):347-54. Epub 2007 Jan 9. Review
- ⁷ Verstraelen H, Verhelst R, Nuytinck L, Roelens K, De Meester E, De Vos D et al. **Gene polymorphisms of Toll-like and related recognition receptors in relation to the vaginal carriage of Gardnerella vaginalis and Atopobium vaginae**. J Reprod Immunol. 2009 Jan;79(2):163-73. Epub 2009 Feb 6
- ⁸ Forsum U, Holst E, Larsson PG, Vasquez A, Jakobsson T, Mattsby-Baltzer I. **Bacterial vaginosis – a microbiological and immunological enigma**. APMIS. 2005 Feb;113(2):81-90. Review
- ⁹ Klomp JM, Verbruggen BS, Korporaal H, Boon ME, de Jong P, Kramer GC et al. **Gardnerella vaginalis and Lactobacillus sp in Liquid-Based Cervical Samples in Healthy and Disturbed Vaginal Flora Using Cultivation-Independent Methods**. Diagn Cytopathol. 2008 May;36(5):277-84
- ¹⁰ Schwebke JR, Richey CM, Weiss HL. **Correlation of behaviours with microbiological changes in vaginal flora**. J Infect Dis. 1999 Nov;180(5):1632-6
- ¹¹ Eschenbach DA, Thwin SS, Patton DL, Hooton TM, Stapleton AE, Agnew K et al. **Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge, and microflora**. Clin Infect Dis. 2000 Jun;30(6):901-7. Epub 2000 Jun 13
- ¹² Srinivasan S, Liu C, Mitchell CM, Fiedler TL, Thomas KK, Agnew KJ et al. **Temporal Variability of Human Vaginal Bacteria and Relationship with Bacterial Vaginosis**. PLoS One. 2010 Apr 15;5(4):e10197
- ¹³ Carlsson J, Gothefors L. **Transmission of Lactobacillus jensenii and Lactobacillus acidophilus from Mother to Child at Time of Delivery**. J Clin Microbiol. 1975 Feb;1(2):124-8
- ¹⁴ Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N et al. **Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns**. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jun 29;107(26):11971-5. Epub 2010 Jun 21
- ¹⁵ Hammerschlag MR, Alpert S, Rosner I, Thurston P, Semine D, McComb D et al. **Microbiology of the vagina in children: normal and potentially pathogenic organisms**. Pediatrics. 1978 Jul;62(1):57-62

-
- ¹⁶ Hill GB, St Claire KK, Gutman LT. **Anaerobes predominate among the vaginal microflora of prepubertal girls.** Clin Infect Dis. 1995 Jun;20 Suppl 2:S269-70.
- ¹⁷ Thoma ME, Gray RH, Kiwanuka N, Aluma S, Wang MC, Sewankambo N et al. **Longitudinal changes in vaginal microbiota composition assessed by Gram stain among never sexually active pre- and postmenarcheal adolescents in Rakai, Uganda.** J Pediatr Adolesc Gynecol. 2011 Feb;24(1):42-7. Epub 2010 Aug 14
- ¹⁸ Soledad B, Barbés C. **Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens.** Microbes Infect. 2000 Apr;2(5):543-6. Review
- ¹⁹ Redondo-Lopez V, Cook RL, Sobel JD. **Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora.** Rev Infect Dis. 1990 Sep-Oct;12(5):856-72. Review
- ²⁰ Skarin A, Sylwan J. **Vaginal lactobacilli inhibiting growth of Gardnerella vaginalis, Mobiluncus and other bacterial species cultured from vaginal content of women with bacterial vaginosis.** Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B. 1986 Dec;94(6):399-403
- ²¹ Vallor AC, Antonio MA, Hawes SE, Hillier SL. **Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal lactobacilli: role of hydrogen peroxide production.** J Infect Dis. 2001 Dec 1;184(11):1431-6. Epub 2001 Oct 30
- ²² Ekmekci H, Aslim B, Ozturk S. **Characterization of vaginal lactobacilli coaggregation ability with Escherichia coli.** Microbiol Immunol. 2009 Feb;53(2):59-65
- ²³ Dover SE, Aroutcheva AA, Faro S, Chikindas ML. **Natural Antimicrobials and Their Role in Vaginal Health: A Short Review.** Int J Probiotics Prebiotics. 2008;3(4):219-230
- ²⁴ Aroutcheva A, Gariti D, Simon M, Shott S, Faro J, Simoes JA et al. **Defense factors of vaginal Lactobacilli.** Am J Obstet Gynecol. 2001 Aug;185(2):375-9
- ²⁵ Pybus V, Onderdonk AB. **Microbial interactions in the vaginal ecosystem, with emphasis on the pathogenesis of bacterial vaginosis.** Microbes Infect. 1999 Apr;1(4):285-92. Review
- ²⁶ Ling Z, Kong J, Liu F, Zhu H, Chen X, Wang Y et al. **Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis.** BMC Genomics. 2010 Sep 7;11:488
- ²⁷ Nyirjesy R. **Vulvovaginal candidiasis and bacterial vaginosis. Review.** Infect Dis Clin North Am. 2008 Dec;22(4):637-52, vi. Review
- ²⁸ Johnson SR, Griffiths H, Humberstone FJ. **Attitudes and experience of women to common vaginal infections.** J Low Genit Tract Dis. 2010 Oct;14(4):287-94
- ²⁹ Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Salembier G, Spitz B. **Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis aerobic vaginitis.** BJOG. 2002 Jan;109(1):34-43
- ³⁰ Tempera G, Furneri PM. **Management of aerobic vaginitis.** Gynecol Obstet Invest. 2010;70(4):244-9. Epub 2010 Oct 16
- ³¹ Donders GG. **Diagnosis and management of bacterial vaginosis and other types of abnormal vaginal bacterial flora: a review.** Obstet Gynecol Surv. 2010 Jul;65(7):462-73. Review

-
- ³² Sweet RL. **Role of bacterial vaginosis in pelvic inflammatory disease.** Clin Infect Dis. 1995 Jun;20 Suppl 2:S271-5. Review
- ³³ Wiesenfeld HC, Hillier SL, Krohn MA, Amortegui AJ, Heine RP, Landers DV et al. **Lower genital tract infection and endometritis: insight into subclinical pelvic inflammatory disease.** Obstet Gynecol. 2002 Sep;100(3):456-63
- ³⁴ Schwebke JR. **Gynecologic consequences of bacterial vaginosis.** Obstet Gynecol Clin North Am. 2003 Dec;30(4):685-94. Review
- ³⁵ Ness RB, Hillier SL, Kip KE, Soper DE, Stamm CA, McGregor JA et al. **Bacterial vaginosis and risk of pelvic inflammatory disease.** Obstet Gynecol. 2004 Oct;104(4):761-9
- ³⁶ Ness RB, Kip KE, Hillier SL, Soper DE, Stamm CA, Sweet RL et al. **A cluster analysis of bacterial vaginosis-associated microflora and pelvic inflammatory disease.** Am J Epidemiol. 2005 Sep 15;162(6):585-90. Epub 2005 Aug 10
- ³⁷ Persson E, Bergström M, Larsson PG, Moberg P, Platz-Christensen JJ, Schedvins K et al. **Infections after hysterectomy. A prospective nation-wide Swedish study. The Study Group on Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology within the Swedish Society of Obstetrics and Gynecology.** Acta Obstet Gynecol Scand. 1996 Sep;75(8):757-61
- ³⁸ Soper DE. **Bacterial vaginosis and postoperative infections.** Am J Obstet Gynecol. 1993 Aug;169(2 Pt 2):467-9. Review
- ³⁹ Larsson PG, Platz-Christensen JJ, Dalaker K, Eriksson K, Fåhræus L, Irminger K et al. **Treatment with 2% clindamycin vaginal cream prior to first trimester surgical abortion to reduce signs of postoperative infection: a prospective, double-blinded, placebo-controlled, multicenter study.** Acta Obstet Gynecol Scand. 2000 May;79(5):390-6
- ⁴⁰ Larsson PG, Platz-Christensen JJ, Thejls H, Forsum U, Pålsson C. **Incidence of pelvic inflammatory disease after first-trimester legal abortion in women with bacterial vaginosis after treatment with metronidazole: a double-blind, randomized study.** Am J Obstet Gynecol. 1992 Jan;166(1 Pt 1):100-3
- ⁴¹ Larsson PG, Bergström M, Forsum U, Jacobsson B, Strand A, Wölner-Hanssen P. **Bacterial vaginosis – Transmission, role in genital tract infection and pregnancy outcome: an enigma.** APMIS. 2005 Apr;113(4):233-45. Review
- ⁴² Wiesenfeld HC, Hillier SL, Krohn MA, Landers DV, Sweet RL. **Bacterial vaginosis is a strong predictor of Neisseria gonorrhoeae and Chlamydia trachomatis infection.** Clin Infect Dis. 2003 Mar 1;36(5):663-8. Epub 2003 Feb 7
- ⁴³ Kaul R, Nagelkerke NJ, Kimani J, Ngugi E, Bwayo JJ, Macdonald KS et al. **Prevalent herpes simplex virus type 2 infection is associated with altered vaginal flora and an increased susceptibility to multiple sexually transmitted infections.** J Infect Dis. 2007 Dec 1;196(11):1692-7. Epub 2007 Oct 25
- ⁴⁴ Martin HL, Richardson BA, Nyange PM, Lavreys L, Hillier SL, Chohan B et al. **Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition.** J Infect Dis. 1999 Dec;180(6):1863-8

-
- ⁴⁵ Atashili J, Poole C, Ndumbe PM, Adimora AA, Smith JS. **Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies.** AIDS. 2008 Jul 31;22(12):1493-501. Review
- ⁴⁶ Hilber AM, Francis SC, Chersich M, Scott P, Redmond S, Bender N et al. **Intravaginal practices, vaginal infections and HIV acquisition: systematic review and meta-analysis.** PLoS One. 2010 Feb 9;5(2):e9119. Review
- ⁴⁷ Farquhar C, Mbori-Ngacha D, Overbaugh J, Wamalwa D, Harris J, Bosire R et al. **Illness during pregnancy and bacterial vaginosis are associated with in-utero HIV-1 transmission.** AIDS. 2010 Jan 2;24(1):153-5
- ⁴⁸ Hay PE. **Bacterial vaginosis and miscarriage.** Curr Opin Infect Dis. 2004 Feb;17(1):41-4. Review
- ⁴⁹ H Verstraelen. **Cutting edge: The vaginal microflora and bacterial vaginosis.** Verh K Acad Geneeskde Belg. 2008;70(3):147-74. Review
- ⁵⁰ Hillier SL, Martius J, Krohn M, Kiviat N, Holmes KK, Eschenbach DA. **A case-control study of chorioamnionic infection and histologic chorioamnionitis in prematurity.** N Engl J Med. 1988 Oct 13;319(15):972-8
- ⁵¹ Hitti J, Hillier SL, Agnew KJ, Krohn MA, Reisner DP, Eschenbach DA. **Vaginal indicators of amniotic fluid infection in preterm labor.** Obstet Gynecol. 2001 Feb;97(2):211-9
- ⁵² Svare JA, Schmidt H, Hansen BB, Lose G. **Bacterial vaginosis in a cohort of Danish pregnant women: prevalence and relationship with preterm delivery, low birthweight and perinatal infections.** BJOG. 2006 Dec;113(12):1419-25
- ⁵³ Donders GG, Van Calsteren K, Bellen G, Reybrouck R, Van den Bosch T, Riphagen I et al. **Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy.** BJOG. 2009 Sep;116(10):1315-24. Epub 2009 Jun 17
- ⁵⁴ Donati L, Di Vico A, Nucci M, Quagliozzi L, Spagnuolo T, Labianca A et al. **Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy.** Arch Gynecol Obstet. 2010 Apr;281(4):589-600. Epub 2009 Dec 5. Review
- ⁵⁵ Witkin SS, Linhares IM, Giraldo P, Ledger WJ et al. **An altered immunity hypothesis for the development of symptomatic bacterial vaginosis.** Clin Infect Dis. 2007 Feb 15;44(4):554-7. Epub 2007 Jan 5. Review. Erratum in: Clin Infect Dis. 2007 May 15;44(10):1398
- ⁵⁶ MR Genc, A Onderdonk. **Endogenous bacterial flora in pregnant women and the influence of maternal genetic variation.** BJOG. 2011 Jan;118(2):154-63. doi: 10.1111/j.1471-0528.2010.02772.x. Epub 2010 Nov 4. Review
- ⁵⁷ A Ugwumadu, I Manyonda F Reid, P Hay. **Effect of early oral clindamycin on late miscarriage and preterm delivery in asymptomatic women with abnormal vaginal flora and bacterial vaginosis: a randomised controlled trial** Lancet. 2003 Mar 22;361(9362):983-8
- ⁵⁸ Kiss H, Petricevic L, Husslein P et al. **Prospective randomised controlled trial of an infection screening programme to reduce the rate of preterm delivery.** BMJ. 2004 Aug 14;329(7462):371. Epub 2004 Aug 4
- ⁵⁹ Kekki M, Kurki T, Kotomäki T, Sintonen H, Paavonen J. **Cost-effectiveness of screening and treatment for bacterial vaginosis in early pregnancy among women at low risk for preterm birth.** Acta Obstet Gynecol Scand. 2004 Jan;83(1):27-36

-
- ⁶⁰ Swadpanich U, Lumbiganon P, Prasertcharoensook W, Laopaiboon M. **Antenatal lower genital tract infection screening and treatment programs for preventing preterm delivery**. Cochrane Database Syst Rev. 2008 Apr 16;(2):CD006178. Review
- ⁶¹ Myrhaug HT, Brurberg KG, Kirkehei I, Reinar LM. **Klindamycin til gravide med asymptomatisk bakteriell vaginose**. Rapport fra Kunnskapssenteret nr. 11. 2010.
- ⁶² Yudin MH, Money DM; Infectious Diseases Committee. **Screening and Management of Bacterial Vaginosis in Pregnancy**. J Obstet Gynaecol Can. 2008 Aug;30(8):702-16
- ⁶³ Donati L, Di Vico A, Nucci M, Quagliozzi L, Spagnuolo T, Labianca A et al. **Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy**. Arch Gynecol Obstet. 2010 Apr;281(4):589-600. Epub 2009 Dec 5. Review
- ⁶⁴ Larsson PG, Fåhræus L, Carlsson B, Jakobsson T, Forsum U. **Late miscarriage and preterm birth after treatment with clindamycin: a randomised consent design study according to Zelen**. BJOG. 2006 Jun;113(6):629-37
- ⁶⁵ Gibbs RS. **Asymptomatic bacterial vaginosis: is it time to treat?** Am J Obstet Gynecol. 2007 Jun;196(6):495-6
- ⁶⁶ Lamont RF, Sawant SR. **Infection in the prediction and antibiotics in the prevention of spontaneous preterm labour and preterm birth**. Minerva Ginecol. 2005 Aug;57(4):423-33. Review
- ⁶⁷ Gazi H, Degerli K, Kurt O, Teker A, Uyar Y, Caglar H et al. **Use of DNA hybridization test for diagnosing bacterial vaginosis in women with symptoms suggestive of infection**. APMIS. 2006 Nov;114(11):784-7
- ⁶⁸ Menard JP, Mazouni C, Fenollar F, Raoult D, Boubli L, Bretelle F. **Diagnostic accuracy of quantitative real-time PCR assay versus clinical and Gram stain identification of bacterial vaginosis**. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010 Dec;29(12):1547-52. Epub 2010 Sep 3
- ⁶⁹ Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. **Reliability of Diagnosing Bacterial Vaginosis Is Improved by a Standardized Method of Gram Stain Interpretation**. J Clin Microbiol. 1991 Feb;29(2):297-301
- ⁷⁰ Forsum U, Hallén A, Larsson PG. **Bacterial vaginosis – a laboratory and clinical diagnostics enigma**. APMIS. 2005 Mar;113(3):153-61. Review
- ⁷¹ Mazzulli T, Simor AE, Low DE. **Reproducibility of interpretation of Gram-stained vaginal smears for the diagnosis of bacterial vaginosis**. J Clin Microbiol. 1990 Jul;28(7):1506-8
- ⁷² Amsel R, Totten PA, Spiegel CA. **Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations**. Am J Med. 1983 Jan;74(1):14-22
- ⁷³ Gutman RE, Peipert JF, Weitzen S, Blume J. **Evaluation of clinical methods for diagnosing bacterial vaginosis**. Obstet Gynecol. 2005 Mar;105(3):551-6
- ⁷⁴ Landers DV, Wiesenfeld HC, Heine RP, Krohn MA, Hillier SL. **Predictive value of the clinical diagnosis of lower genital tract infection in women**. Am J Obstet Gynecol. 2004 Apr;190(4):1004-10
- ⁷⁵ Navarrete P, Domínguez M, Castro E, Zemelman R. **Evaluation of Nugent and Amsel criteria for the diagnosis of bacterial vaginosis**. Rev Med Chil. 2000 Jul;128(7):767-71
- ⁷⁶ Schwebke JR, Hillier SL, Sobel JD, McGregor JA, Sweet RL. **Validity of the vaginal Gram stain for the diagnosis of bacterial vaginosis**. Obstet Gynecol. 1996 Oct;88(4 Pt 1):573-6

-
- ⁷⁷ Mastrobattista JM, Bishop KD, Newton ER. **Wet smear compared with gram stain diagnosis of bacterial vaginosis in asymptomatic pregnant women.** *Obstet Gynecol.* 2000 Oct;96(4):504-6
- ⁷⁸ Hillier SL. **Diagnostic microbiology of bacterial vaginosis** *Am J Obstet Gynecol.* 1993. Aug;169(2 Pt 2):455-9. Review
- ⁷⁹ Wolrath H, Forsum U, Larsson PG, Borén H. **Analysis of bacterial vaginosis-related amines in vaginal fluid by gas chromatography and mass spectrometry.** *J Clin Microbiol.* 2001 Nov;39(11):4026-31
- ⁸⁰ Chaim W, Karpas Z, Lorber A. **New technology for diagnosis of bacterial vaginosis.** *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003 Nov 10;111(1):83-7
- ⁸¹ Wolrath H, Borén H, Hallén A, Forsum U. **Trimethylamine content in vaginal secretion and its relation to bacterial vaginosis.** *APMIS.* 2002 Nov;110(11):819-24
- ⁸² Stanek R, Gain RE, Glover DD, Larsen B. **High performance ion exclusion chromatographic characterization of the vaginal organic acids in women with bacterial vaginosis.** *Biomed Chromatogr.* 1992 Sep-Oct;6(5):231-5
- ⁸³ Thomason JL, Gelbart SM, Wilcoski LM, Peterson AK, Jilly BJ, Hamilton PR. **Proline aminopeptidase activity as a rapid diagnostic test to confirm bacterial vaginosis.** *Obstet Gynecol.* 1988 Apr;71(4):607-11
- ⁸⁴ Schoonmaker JN, Lunt BD, Lawellin DW, French JI, Hillier SL, McGregor JA. **A new proline aminopeptidase assay for diagnosis of bacterial vaginosis.** *Am J Obstet Gynecol.* 1991 Sep;165(3):737-42
- ⁸⁵ Briselden AM, Moncla BJ, Stevens CE, Hillier SL. **Sialidases (neuraminidases) in bacterial vaginosis and bacterial vaginosis-associated microflora.** *J Clin Microbiol.* 1992 Mar;30(3):663-6
- ⁸⁶ Wiggins R, Crowley T, Horner PJ, Soothill PW, Millar MR, Corfield AP. **Use of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-alpha-D-N-acetylneuraminic acid in a novel spot test To identify sialidase activity in vaginal swabs from women with bacterial vaginosis.** *J Clin Microbiol.* 2000 Aug;38(8):3096-7
- ⁸⁷ Robertson AM, Wiggins R, Horner PJ, Greenwood R, Crowley T, Fernandes A et al. **A novel bacterial mucinase, glycosulfatase, is associated with bacterial vaginosis.** *J Clin Microbiol.* 2005 Nov;43(11):5504-8
- ⁸⁸ Kampan NC, Suffian SS, Ithnin NS, Muhammad M, Zakaria SZ, Jamil MA. **Evaluation of BV(®) Blue Test Kit for the diagnosis of bacterial vaginosis.** *Sex Reprod Healthc.* 2011 Jan;2(1):1-5. Epub 2010 Nov 18
- ⁸⁹ Sumeksri P, Kopraser C, Panichkul S. **BVBLUE test for diagnosis of bacterial vaginosis in pregnant women attending antenatal care at Phramongkutklao Hospital.** *J Med Assoc Thai.* 2005 Nov;88 Suppl 3:S7-13
- ⁹⁰ Bradshaw CS, Morton AN, Garland SM, Horvath LB, Kuzevska I, Fairley CK. **Evaluation of a point-of-care test, BVBlue, and clinical and laboratory criteria for diagnosis of bacterial vaginosis.** *J Clin Microbiol.* 2005 Mar;43(3):1304-8
- ⁹¹ Myziuk L, Romanowski B, Johnson SC. **BVBlue test for diagnosis of bacterial vaginosis.** *J Clin Microbiol.* 2003 May;41(5):1925-8
- ⁹² Larsson PG, Forsum U. **Bacterial vaginosis – a disturbed bacterial flora and treatment enigma.** *APMIS.* 2005 May;113(5):305-16. Review

-
- ⁹³ Workowski KA, Berman SM, Centers for Disease Control and Prevention. **Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010**. MMWR Recomm Rep. 2010 Dec 17;59(RR-12):1-110. Erratum in: MMWR Recomm Rep. 2011 Jan 14;60(1):18
- ⁹⁴ Livengood CH, Ferris DG, Wiesenfeld HC, Hillier SL, Soper DE, Nyirjesy P et al. **Effectiveness of two tinidazole regimens in treatment of bacterial vaginosis: a randomized controlled trial**. Obstet Gynecol. 2007 Aug;110(2 Pt 1):302-9
- ⁹⁵ Livengood CH. **Bacterial vaginosis: An overview for 2009**. Rev Obstet Gynecol. 2009 Winter;2(1):28-37
- ⁹⁶ Sobel JD, Ferris D, Schwebke J, Nyirjesy P, Wiesenfeld HC, Peipert J et al. **Suppressive antibacterial therapy with 0.75% metronidazole vaginal gel to prevent recurrent bacterial vaginosis**. Am J Obstet Gynecol. 2006 May;194(5):1283-9. Epub 2006 Apr 21
- ⁹⁷ Bradshaw CS, Morton AN, Hocking J, Garland SM, Morris MB, Moss LM et al. **High recurrence rates of bacterial vaginosis over the course of 12 months after oral metronidazole therapy and factors associated with recurrence**. J Infect Dis. 2006 Jun 1;193(11):1478-86. Epub 2006 Apr 26
- ⁹⁸ Ozkinay E, Terek MC, Yayci M, Kaiser R, Grob P, Tuncay G. **The effectiveness of live lactobacilli in combination with low dose oestriol (Gynoflor) to restore the vaginal flora after treatment of vaginal infections**. BJOG. 2005 Feb;112(2):234-40
- ⁹⁹ Wineslaus SJ, Calver G. **Recurrent bacterial vaginosis - an old approach to a new problem**. Int J STD AIDS. 1996 Jul;7(4):284-7
- ¹⁰⁰ Senok AC, Verstraeten H, Temmerman M, Botta GA. **Probiotics for the treatment of bacterial vaginosis**. Cochrane Database Syst Rev. 2009 Oct 7;(4):CD006289. Review
- ¹⁰¹ Marrazzo JM, Martin DH, Watts DH, Schulte J, Sobel JD, Hillier SL et al. **Bacterial vaginosis: Identifying research gaps proceedings of a workshop sponsored by DHHS/NIH/NIAID**. Sex Transm Dis. 2010 Dec;37(12):732-44
- ¹⁰² Lamont R, Sobel J, Akins R, Hassan S, Chaiworapongsa T, Kusanovic J et al. **The vaginal microbiome: New information about genital tract flora using molecular based techniques**. BJOG. 2011 Jan 20. doi: 10.1111/j.1471-0528.2010.02840.x. [Epub ahead of print]
- ¹⁰³ Ingiani A, Petruzzelli S, Morandotti G, Pompei R. **Genotypic differentiation of Gardnerella vaginalis by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)**. FEMS Immunol Med Microbiol. 1997 May;18(1):61-6
- ¹⁰⁴ Sundquist A, Bigdeli S, Jalili R, Druzin ML, Waller S, Pullen KM et al. **Bacterial flora-typing with targeted, chip-based Pyrosequencing**. BMC Microbiol. 2007 Nov 30;7:108
- ¹⁰⁵ Vitali B, Pugliese C, Biagi E, Candela M, Turrone S, Bellen G et al. **Dynamics of Vaginal Bacterial Communities in Women Developing Bacterial Vaginosis, Candidiasis, or No Infection, Analyzed by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Real-Time PCR**. Appl Environ Microbiol. 2007 Sep;73(18):5731-41. Epub 2007 Jul 20
- ¹⁰⁶ Srinivasan S, Fredricks DN. **The Human Vaginal Bacterial Biota and Bacterial Vaginosis**. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2008;2008:750479. Epub 2009 Feb 16

-
- ¹⁰⁷ Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Delanghe J, Van Simaey L et al. **Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis.** BMC Microbiol. 2004 Apr 21;4:16
- ¹⁰⁸ Döderlein A. **Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das Puerperalfieber.** Zentbl Bakteriol. 1892; 11: 699
- ¹⁰⁹ Thomas S. **Döderlein's Bacillus: *Lactobacillus acidophilus*.** J Infect dis. 1928;43:218-27
- ¹¹⁰ Fujisawa T, Benno Y, Yaeshima T, Mitsuoka T. **Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus johnsonii* sp. nov. and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* group A3 (Johnson et al. 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura 1981).** Int J Syst Bacteriol. 1992 Jul;42(3):487-91
- ¹¹¹ Giorgi A, Torriani S, Dellaglio F, Bo G, Stola E, Bernuzzi L. **Identification of vaginal lactobacilli from asymptomatic women.** Microbiologica. 1987 Oct;10(4):377-84
- ¹¹² Boyd MA, Antonio MA, Hillier SL. **Comparison of API 50 CH strips to whole-chromosomal DNA probes for identification of *Lactobacillus* species.** J Clin Microbiol. 2005 Oct;43(10):5309-11
- ¹¹³ Falsen E, Pascual C, Sjöden B, Ohlén M, Collins MD. **Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. Nov.** Int J Syst Bacteriol. 1999 Jan;49 Pt 1:217-21
- ¹¹⁴ Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, Oakley BB, Marrazzo JM. **Targeted PCR for Detection of Vaginal Bacteria Associated with Bacterial Vaginosis.** J Clin Microbiol. 2007 Oct;45(10):3270-6. Epub 2007 Aug 8
- ¹¹⁵ Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. **Molecular Identification of Bacteria Associated with Bacterial Vaginosis.** N Engl J Med. 2005 Nov 3;353(18):1899-911
- ¹¹⁶ Burton JP, Reid G. **Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (Nugent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques.** J Infect Dis. 2002 Dec 15;186(12):1770-80. Epub 2002 Nov 22
- ¹¹⁷ Wertz J, Isaacs-Cosgrove N, Holzman C, Marsh TL. **Temporal Shifts in Microbial Communities in Nonpregnant African-American Women with and without Bacterial Vaginosis.** Interdiscip Perspect Infect Dis. 2008;2008:181253. Epub 2009 Jan 27
- ¹¹⁸ Branco KM, Nardi RM, Moreira JL, Nunes AC, Farias LM, Nicoli JR et al. **Identification and in vitro production of *Lactobacillus* antagonists from women with or without bacterial vaginosis.** Braz J Med Biol Res. 2010 Apr;43(4):338-44. Epub 2010 Mar 6
- ¹¹⁹ Antonio MA, Hawes SE, Hillier SL. **The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species.** J Infect Dis. 1999 Dec;180(6):1950-6
- ¹²⁰ Antonio M, Rabe L, Hillier S. **Colonization of the rectum by *Lactobacillus* species and decreased risk of bacterial vaginosis.** J Infect Dis. 2005 Aug 1;192(3):394-8. Epub 2005 Jun 28
- ¹²¹ Wertz J, Isaacs-Cosgrove N, Holzman C, Marsh TL. **Temporal Shifts in Microbial Communities in Nonpregnant African-American Women with and without Bacterial Vaginosis.** Interdiscip Perspect Infect Dis. 2008;2008:181253. Epub 2009 Jan 27

-
- ¹²² Hawes SE, Hillier SL, Benedetti J, Stevens CE, Koutsky LA, Wolner-Hanssen P et al. **Hydrogen peroxide-producing lactobacilli and acquisition of vaginal infections.** J Infect Dis. 1996 Nov;174(5):1058-63
- ¹²³ Klebanoff SJ, Hillier SL, Eschenbach DA, Waltersdorff AM. **Control of the microbial flora of the vagina by H₂O₂-generating lactobacilli.** J Infect Dis. 1991 Jul;164(1):94-100
- ¹²⁴ Eschenbach DA, Davick PR, Williams BL, Klebanoff SJ, Young-Smith K, Critchlow CM et al. **Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis.** J Clin Microbiol. 1989 Feb;27(2):251-6
- ¹²⁵ Ocaña VS, Pesce de Ruiz Holgado AA, Nader-Macías ME. **Selection of vaginal H₂O₂-generating *Lactobacillus* species for probiotic use.** Curr Microbiol. 1999 May;38(5):279-84
- ¹²⁶ Wilks M, Wiggins R, Whiley A, Hennessy E, Warwick S, Porter H et al. **Identification and H₂O₂ production of vaginal lactobacilli from pregnant women at high risk of preterm birth and relation with outcome.** J Clin Microbiol. 2004 Feb;42(2):713-7
- ¹²⁷ Song YL, Kato N, Matsumiya Y, Liu CX, Kato H, Watanabe K. **Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal lactobacilli isolated from Japanese women and newborn infants.** J Clin Microbiol. 1999 Sep;37(9):3062-4
- ¹²⁸ Donders GG. **Microscopy of bacterial flora on fresh vaginal smears.** Infect Dis Obstet Gynecol. 1999;7(4):177-9
- ¹²⁹ Donders GG. **Lactobacilli in Papanicolaou smears, genital infections, and pregnancy.** Am J Perinatol. 1993 Sep;10(5):358-61
- ¹³⁰ Hay PE. **Abnormal bacterial colonisation of the genital tract and subsequent preterm delivery and late miscarriage.** BMJ. 1994 Jan 29;308(6924):295-8
- ¹³¹ Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Van Simaey L, De Ganck C et al. **Comparison between Gram stain and culture for the characterization of vaginal microflora: definition of a distinct grade that resembles grade I microflora and revised categorization of grade I microflora.** BMC Microbiol. 2005 Oct 14;5:61
- ¹³² Hummelen R, Fernandes AD, Macklaim JM, Dickson RJ, Chantalucha J, Gloor GB et al. **Deep Sequencing of the Vaginal Microbiota of Women with HIV.** PLoS One. 2010 Aug 12;5(8):e12078
- ¹³³ Pavlova SI, Kilic AO, Kilic SS, So JS, Nader-Macias ME, Simoes JA et al. **Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences.** J Appl Microbiol. 2002;92(3):451-9
- ¹³⁴ Silvester ME, Dicks LM. **Identification of lactic acid bacteria isolated from human vaginal secretions.** Antonie Van Leeuwenhoek. 2003;83(2):117-23
- ¹³⁵ Tärnberg M, Jakobsson T, Jonasson J, Forsum U. **Identification of randomly selected colonies of lactobacilli from normal vaginal fluid by pyrosequencing of the 16S rDNA variable V1 and V3 regions.** APMIS. 2002 Nov;110(11):802-10
- ¹³⁶ Vázquez A, Jakobsson T, Ahrné S, Forsum U, Molin G. **Vaginal *Lactobacillus* Flora of Healthy Swedish Women.** J Clin Microbiol. 2002 Aug;40(8):2746-9

-
- ¹³⁷ Burton JP, Cadieux PA, Reid G. **Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic installation.** Appl Environ Microbiol. 2003 Jan;69(1):97-101
- ¹³⁸ Devillard E, Burton JP, Hammond JA, Lam D, Reid G. **Novel insight into the vaginal microflora in postmenopausal women under hormone replacement therapy as analyzed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis.** Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2004 Nov 10;117(1):76-81
- ¹³⁹ Coolen MJ, Post E, Davis CC, Forney LJ. **Characterization of Microbial Communities Found in the Human Vagina by Analysis of Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of 16S rRNA Genes.** Appl Environ Microbiol. 2005 Dec;71(12):8729-37
- ¹⁴⁰ Hill JE, Goh SH, Money DM, Doyle M, Li A, Crosby WL et al. **Characterization of vaginal microflora of healthy, nonpregnant women by chaperonin-60 sequence-based methods.** Am J Obstet Gynecol. 2005 Sep;193(3 Pt 1):682-92
- ¹⁴¹ Hyman RW, Fukushima M, Diamond L, Kumm J, Giudice LC, Davis RW. **Microbes on the human vaginal epithelium.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 May 31;102(22):7952-7. Epub 2005 May 23
- ¹⁴² Anukam KC, Osazuwa EO, Ahonkhai I, Reid G. **Lactobacillus vaginal microbiota of women attending a reproductive health care service in Benin city, Nigeria.** Sex Transm Dis. 2006 Jan;33(1):59-62
- ¹⁴³ Stoyancheva GD, Danova ST, Boudakov IY. **Molecular identification of vaginal lactobacilli isolated from Bulgarian women.** Antonie Van Leeuwenhoek. 2006 Oct;90(3):201-10. Epub 2006 Jul 27
- ¹⁴⁴ Anukam K, Reid G. **Organisms associated with bacterial vaginosis in Nigerian women as determined by PCR-DGGE and 16S rRNA gene sequence.** Afr Health Sci. 2007 Jun;7(2):68-72
- ¹⁴⁵ Nam H, Whang K, Lee Y. **Analysis of Vaginal Lactic Acid Producing Bacteria in Healthy Women.** J Microbiol. 2007 Dec;45(6):515-20
- ¹⁴⁶ Tamrakar R, Yamada T, Furuta I, Cho K, Morikawa M, Yamada H et al. **Association between Lactobacillus species and bacterial vaginosis-related bacteria, and bacterial vaginosis scores in pregnant Japanese women.** BMC Infect Dis. 2007 Nov 7;7:128
- ¹⁴⁷ Thies FL, König W, König B. **Rapid characterization of the normal and disturbed vaginal microbiota by application of 16S rRNA gene terminal RFLP fingerprinting.** J Med Microbiol. 2007 Jun;56(Pt 6):755-61
- ¹⁴⁸ Zhou X, Brown CJ, Abdo Z, Davis CC, Hansmann MA, Joyce P et al. **Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women.** ISME J. 2007 Jun;1(2):121-33. Epub 2007 May 10
- ¹⁴⁹ Martinez RC, Franceschini SA, Patta MC, Quintana SM, Nunes AC, Moreira JL et al. **Analysis of Vaginal Lactobacilli from Healthy and Infected Brazilian Women.** Appl Environ Microbiol. 2008 Jul;74(14):4539-42. Epub 2008 May 23
- ¹⁵⁰ Oakley BB, Fiedler TL, Marrazzo JM, Fredricks DN. **Diversity of Human Vaginal Bacterial Communities and Associations with Clinically Defined Bacterial Vaginosis.** Appl Environ Microbiol. 2008 Aug;74(15):4898-909. Epub 2008 May 16

-
- ¹⁵¹ Biagi E, Vitali B, Pugliese C, Candela M, Donders GG, Brigidi P. **Quantitative variations in the vaginal bacterial population associated with asymptomatic infections a real-time polymerase chain reaction study.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009 Mar;28(3):281-5. Epub 2008 Sep 2
- ¹⁵² Garg KB, Ganguli I, Das R, Talwar GP. **Spectrum of Lactobacillus species present in healthy vagina of Indian women.** Indian J Med Res. 2009 Jun;129(6):652-7
- ¹⁵³ Shi Y, Chen L, Tong J, Xu C. **Preliminary characterization of vaginal microbiota in healthy Chinese women using cultivation-independent methods.** J Obstet Gynaecol Res. 2009 Jun;35(3):525-32
- ¹⁵⁴ Verstraelen H, Verhelst R, Claey s G, De Backer E, Temmerman M, Vaneechoutte M. **Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that L. crispatus promotes the stability of the normal vaginal microflora, and that L. gasseri and/or L. iners are more conducive to the occurrence of abnormal vaginal microflora.** BMC Microbiol. 2009 Jun 2;9:116
- ¹⁵⁵ Yamamoto T, Zhou X, Williams CJ, Hochwalt A, Forney LJ. **Bacterial Populations in the Vaginas of Healthy Adolescent Women.** J Pediatr Adolesc Gynecol. 2009 Feb;22(1):11-8
- ¹⁵⁶ Zhou X, Hansmann MA, Davis CC, Suzuki H, Brown CJ, Schütte U et al. **The vaginal bacterial communities of Japanese women resemble those of women in other racial groups.** FEMS Immunol Med Microbiol. 2010 Mar;58(2):169-81. Epub 2009 Oct 3
- ¹⁵⁷ J Ravel, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL et al. **Microbes and Health Sackler Colloquium: Vaginal microbiome of reproductive-age women.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Aug 19. [Epub ahead of print]
- ¹⁵⁸ Zozaya-Hinchliffe M, Lillis R, Martin DH, Ferris MJ. **Quantitative PCR Assessments of Bacterial Species in Women with and without Bacterial Vaginosis.** J Clin Microbiol. 2010 May;48(5):1812-9. Epub 2010 Mar 19
- ¹⁵⁹ De Backer E, Verhelst R, Verstraelen H, Alqumber MA, Burton JP, Tagg JR et al. **Quantitative determination by real-time PCR of four vaginal Lactobacillus species, Gardnerella vaginalis and Atopobium vaginae indicates an inverse relationship between L. gasseri and L. iners.** BMC Microbiol. 2007 Dec 19;7:115
- ¹⁶⁰ Donders GG, Van Bulck B, Van de Walle P, Kaiser RR, Pohlig G, Gonser S et al. **Effect of lyophilized lactobacilli and 0.03 mg estriol (Gynoflor®) on vaginitis and vaginosis with disrupted vaginal microflora: a multicenter, randomized, single-blind, active-controlled pilot study.** Gynecol Obstet Invest. 2010;70(4):264-72. Epub 2010 Oct 16
- ¹⁶¹ Ozkinay E, Terek MC, Yayci M, Kaiser R, Grob P, Tuncay G. **The effectiveness of live lactobacilli in combination with low dose oestriol (Gynoflor) to restore the vaginal flora after treatment of vaginal infections.** BJOG. 2005 Feb;112(2):234-40
- ¹⁶² Parent D, Bossens M, Bayot D, Kirkpatrick C, Graf F, Wilkinson FE et al. **Therapy of bacterial vaginosis using exogenously-applied Lactobacilli acidophili and a low dose of estriol: a placebo-controlled multicentric clinical trial.** Arzneimittelforschung. 1996 Jan;46(1):68-73
- ¹⁶³ Chernes TL, Hillier SL, Meyn LA, Busch JL, Krohn MA. **A delicate balance: risk factors for acquisition of bacterial vaginosis include sexual activity, absence of hydrogen peroxide-producing lactobacilli, black race, and positive herpes simplex virus type 2 serology .** Sex Transm Dis. 2008 Jan;35(1):78-83

-
- ¹⁶⁴ Ling Z, Liu X, Chen X, Zhu H, Nelson KE, Xia Y et al. **Diversity of Cervicovaginal Microbiota Associated with Female Lower Genital Tract Infections.** Microb Ecol. 2011 Feb 2. [Epub ahead of print]
- ¹⁶⁵ Catlin BW. **Gardnerella vaginalis: characteristics, clinical considerations, and controversies.** Clin Microbiol Rev. 1992 Jul;5(3):213-37. Review
- ¹⁶⁶ Menard JP, Fenollar F, Henry M, Bretelle F, Raoult D. **Molecular Quantification of Gardnerella vaginalis and Atopobium vaginae Loads to Predict Bacterial Vaginosis.** Clin Infect Dis. 2008 Jul 1;47(1):33-43
- ¹⁶⁷ Aroutcheva AA, Simoes JA, Behbakht K, Faro S. **Gardnerella vaginalis isolated from patients with bacterial vaginosis and from patients with healthy vaginal ecosystems.** Clin Infect Dis. 2001 Oct 1;33(7):1022-7. Epub 2001 Sep 5
- ¹⁶⁸ Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, Ladhoff A, Swidsinski S, Hale LP et al. **Adherent biofilms in bacterial vaginosis.** Obstet Gynecol. 2005 Nov;106(5 Pt 1):1013-23
- ¹⁶⁹ Yeoman CJ, Yildirim S, Thomas SM, Durkin AS, Torralba M, Sutton G et al. **Comparative genomics of Gardnerella vaginalis strains reveals substantial differences in metabolic and virulence potential.** PloS One. 2010 Aug 26;5(8):e12411
- ¹⁷⁰ Patterson JL, Stull-Lane A, Girerd PH, Jefferson KK. **Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of Gardnerella vaginalis relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes.** Microbiology. 2010 Feb;156(Pt 2):392-9. Epub 2009 Nov 12
- ¹⁷¹ Harwich MD Jr, Alves JM, Buck GA, Strauss JF 3rd, Patterson JL, Oki AT et al. **Drawing the line between commensal and pathogenic Gardnerella vaginalis through genome analysis and virulence studies.** BMC Genomics. 2010 Jun 11;11:375
- ¹⁷² Rodriguez Jovita M, Collins MD, Sjöden B, Falsen E. **Characterization of a novel Atopobium isolate from the human vagina description of Atopobium vaginae sp. Nov.** Int J Syst Bacteriol. 1999 Oct;49 Pt 4:1573-6
- ¹⁷³ Ferris MJ, Masztal A, Aldridge KE, Fortenberry JD, Fidel PL Jr, Martin DH. **Association of Atopobium vaginae, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis.** BMC Infect Dis. 2004 Feb 13;4:5
- ¹⁷⁴ De Backer E, Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Temmerman M et al. **Antibiotic susceptibility of Atopobium vaginae.** BMC Infect Dis. 2006 Mar 16;6:51
- ¹⁷⁵ Bradshaw CS, Tabrizi SN, Fairley CK, Morton AN, Rudland E, Garland SM. **The association of Atopobium vaginae and Gardnerella vaginalis with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy.** J Infect Dis. 2006 Sep 15;194(6):828-36. Epub 2006 Aug 16
- ¹⁷⁶ Ferris MJ, Norori J, Zozaya-Hinchliffe M, Martin DH. **Cultivation-independent analysis of changes in bacterial vaginosis flora following metronidazole treatment.** J Clin Microbiol. 2007 Mar;45(3):1016-8. Epub 2007 Jan 3
- ¹⁷⁷ Lau SK, Woo PC, Fung AM, Chan KM, Woo GK, Yuen KY. **Anaerobic, non-sporulating, Gram-positive bacilli bacteraemia characterized by 16S rRNA gene sequencing.** J Med Microbiol. 2004 Dec;53(Pt 12):1247-53
- ¹⁷⁸ Zozaya-Hinchliffe M, Martin DH, Ferris MJ. **Prevalence and abundance of uncultivated Megasphaera-like bacteria in the human vaginal environment.** Appl Environ Microbiol. 2008 Mar;74(5):1656-9. Epub 2008 Jan 18

-
- ¹⁷⁹ Pybus V, Onderdonk AB. **Evidence for a commensal, symbiotic relationship between *Gardnerella vaginalis* and *Prevotella bivia* involving ammonia: potential significance for bacterial vaginosis.** J Infect Dis. 1997 Feb;175(2):406-13
- ¹⁸⁰ Schwebke JR, Lawing LF. **Prevalence of *Mobiluncus* spp among women with and without bacterial vaginosis as detected by polymerase chain reaction.** Sex Transm Dis. 2001 Apr;28(4):195-9
- ¹⁸¹ Gatti M. **Isolation of *Mobiluncus* species from the human vagina.** Zentralbl Bakteriол. 2000 Jan;289(8):869-78
- ¹⁸² Meltzer MC, Desmond RA, Schwebke JR. **Association of *Mobiluncus curtisii* with recurrence of bacterial vaginosis.** Sex Transm Dis. 2008 Jun;35(6):611-3
- ¹⁸³ Marrazzo JM, Thomas KK, Fiedler TL, Ringwood K, Fredricks DN. **Risks for acquisition of bacterial vaginosis among women who report sex with women: a cohort study.** PLoS One. 2010 Jun 15;5(6):e11139
- ¹⁸⁴ Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, Mitchell CM, Marrazzo JM. **Changes in vaginal bacterial concentrations with intravaginal metronidazole therapy for bacterial vaginosis as assessed by quantitative PCR.** J Clin Microbiol. 2009 Mar;47(3):721-6. Epub 2009 Jan 14
- ¹⁸⁵ Allsworth JE, Peipert JF. **Prevalence of bacterial vaginosis: 2001-2004 National health and nutrition examination survey data.** Obstet Gynecol. 2007 Jan;109(1):114-20
- ¹⁸⁶ Koumans EH, Sternberg M, Bruce C, McQuillan G, Kendrick J, Sutton M et al. **The prevalence of bacterial vaginosis in the United States, 2001-2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health.** Sex Transm Dis. 2007 Nov;34(11):864-9
- ¹⁸⁷ Cottrell BH. **An updated review of evidence to discourage douching.** MCN Am J Matern Child Nurs. 2010 Mar-Apr;35(2):102-7; quiz 108-9. Review
- ¹⁸⁸ Verstraelen H, Verhelst R, Vaneechoutte M, Temmerman M. **The epidemiology of bacterial vaginosis in relation to sexual behaviour.** BMC Infect Dis. 2010 Mar 30;10:81
- ¹⁸⁹ Fethers KA, Fairley CK, Hocking JS, Gurrin LC, Bradshaw CS. **Sexual risk factors and bacterial vaginosis: a systematic review and meta-analysis.** Clin Infect Dis. 2008 Dec 1;47(11):1426-35. Review
- ¹⁹⁰ Gardner HL, Dukes CD. ***Haemophilus vaginalis* vaginitis: a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis.** Am J Obstet Gynecol. 1955 May;69(5):962-76
- ¹⁹¹ Criswell BS, Ladwig CL, Gardner HL, Dukes CD. ***Haemophilus vaginalis*: vaginitis by inoculation from culture.** Obstet Gynecol. 1969 Feb;33(2):195-9
- ¹⁹² Marrazzo JM, Koutsky LA, Eschenbach DA, Agnew K, Stine K, Hillier SL. **Characterization of Vaginal Flora and Bacterial Vaginosis in Women Who Have Sex with Women.** J Infect Dis. 2002 May 1;185(9):1307-13. Epub 2002 Apr 16
- ¹⁹³ Berger BJ, Kolton S, Zenilman JM, Cummings MC, Feldman J, McCormack WM. **Bacterial vaginosis in lesbians: A sexually transmitted disease.** Clin Infect Dis. 1995 Dec;21(6):1402-5
- ¹⁹⁴ Marrazzo JM, Thomas KK, Agnew K, Ringwood K. **Prevalence and risks for bacterial vaginosis in women who have sex with women.** Sex Transm Dis. 2010 May;37(5):335-9

-
- ¹⁹⁵ Schwebke JR, Rivers C, Lee J. **Prevalence of Gardnerella vaginalis in Male Sexual Partners of Women With and Without Bacterial Vaginosis.** Sex Transm Dis. 2009 Feb;36(2):92-4
- ¹⁹⁶ Dawson SG, Ison CA, Csonka G, Easmon CS. **Male carriage of Gardnerella vaginalis.** Br J Vener Dis. 1982 Aug;58(4):243-5
- ¹⁹⁷ Wahl NG, Castilla MA, Lewis-Abney K. **Prevalence of Gardnerella vaginalis in Prepubertal Males.** Arch Pediatr Adolesc Med. 1998 Nov;152(11):1095-9
- ¹⁹⁸ Kumar B, Dawn G, Sharma M, Malla N. **Urethral flora in adolescent boys.** Genitourin Med. 1995 Oct;71(5):328-9
- ¹⁹⁹ Holst E. **Reservoir of four organisms associated with bacterial vaginosis suggests lack of sexual transmission.** J Clin Microbiol. 1990 Sep;28(9):2035-9
- ²⁰⁰ Verstraelen H. **Bacterial vaginosis: A sexually enhanced disease.** Int J STD AIDS. 2008 Aug;19(8):575-6
- ²⁰¹ Yen S, Shafer MA, Moncada J, Campbell CJ, Flinn SD, Boyer CB. **Bacterial vaginosis in sexually experienced and non-sexually experienced young women entering the military.** Obstet Gynecol. 2003 Nov;102(5 Pt 1):927-33
- ²⁰² Bump RC, Buesching WJ. **Bacterial vaginosis in virginal and sexually active adolescent females: evidence against exclusive sexual transmission.** Am J Obstet Gynecol. 1988 Apr;158(4):935-9
- ²⁰³ Tabrizi SN, Fairley CK, Bradshaw CS, Garland SM. **Prevalence of Gardnerella vaginalis and Atopobium vaginae in virginal women.** Sex Transm Dis. 2006 Nov;33(11):663-5
- ²⁰⁴ Papanikolaou EG. **Recurrent Bacterial Vaginosis in a Virgin Adolescent: A New Method of Treatment.** Infection. 2002 Dec;30(6):403-4
- ²⁰⁵ Bartley DL, Morgan L, Rimsza ME. **Gardnerella vaginalis in prepubertal girls.** Am J Dis Child. 1987 Sep;141(9):1014-7
- ²⁰⁶ Hammerschlag MR, Cummings M, Doraiswamy B, Cox P, McCormack WM. **Nonspecific vaginitis following sexual abuse in children..** Pediatrics. 1985 Jun;75(6):1028-31
- ²⁰⁷ Moi H, Erkkola R, Jerve F, Nelleman G, Bymose B, Alaksen K et al. **Should male consorts of women with bacterial vaginosis be treated?** Genitourin Med. 1989 Aug;65(4):263-8
- ²⁰⁸ Vejtorp M, Bollerup AC, Vejtorp L, Fanø E, Nathan E, Reiter A et al. **Bacterial vaginosis: a double-blind randomized trial of the effect of treatment of the sexual partner.** Br J Obstet Gynaecol. 1988 Sep;95(9):920-6
- ²⁰⁹ Swedberg J, Steiner JF, Deiss F, Steiner S, Driggers DA. **Comparison of single-dose vs one-week course of metronidazole for symptomatic bacterial vaginosis.** JAMA. 1985 Aug 23-30;254(8):1046-9
- ²¹⁰ Mengel MB, Berg AO, Weaver CH, Herman DJ, Herman SJ, Hughes VL. **The effectiveness of single-dose metronidazole therapy for patients and their partners with bacterial vaginosis.** J Fam Pract. 1989 Feb;28(2):163-71
- ²¹¹ Colli E, Landoni M, Parazzini F. **Treatment of male partners and recurrence of bacterial vaginosis: a randomised trial.** Genitourin Med. 1997 Aug;73(4):267-70

-
- ²¹² Vutyavanich T, Pongsuthirak P, Vannareumol P, Ruangsri RA, Luangsook P. **A randomized double-blind trial of tinidazole treatment of the sexual partners of females with bacterial vaginosis.** *Obstet Gynecol.* 1993 Oct;82(4 Pt 1):550-4
- ²¹³ Potter J. **Should sexual partners of women with bacterial vaginosis receive treatment?** *Br J Gen Pract.* 1999 Nov;49(448):913-8
- ²¹⁴ Swidsinski A, Doerffel Y, Loening-Baucke V, Swidsinski S, Verstraelen H, Vaneechoutte M et al. **Gardnerella biofilm involves females and males and is transmitted sexually.** *Gynecol Obstet Invest.* 2010;70(4):256-63. Epub 2010 Oct 16
- ²¹⁵ Saunders S, Bocking A, Challis J, Reid G. **Effect of Lactobacillus challenge on Gardnerella vaginalis biofilms.** *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2007 Apr 1;55(2):138-42. Epub 2006 Dec 9
- ²¹⁶ Patterson JL, Girerd PH, Karjane NW, Jefferson KK. **Effect of biofilm phenotype on resistance of Gardnerella vaginalis to hydrogen peroxide and lactic acid.** *Am J Obstet Gynecol.* 2007 Aug;197(2):170.e1-7
- ²¹⁷ Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, Swidsinski S, Dörffel Y, Scholze J i et al. **An adherent Gardnerella vaginalis biofilm persists on the vaginal epithelium after standard therapy with oral metronidazole.** *Am J Obstet Gynecol.* 2008 Jan;198(1):97.e1-6. Epub 2007 Nov 19
- ²¹⁸ Swidsinski A, Dörffel Y, Loening-Baucke V, Mendling W, Verstraelen H, Dieterle S et al. **Desquamated epithelial cells covered with a polymicrobial biofilm typical for bacterial vaginosis are present in randomly selected cryopreserved donor semen.** *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010 Aug;59(3):399-404. Epub 2010 Apr 20
- ²¹⁹ Swidsinski A, Dörffel Y, Loening-Baucke V, Schilling J, Mendling W. **Response of Gardnerella vaginalis biofilm to 5 days of moxifloxacin treatment.** *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011 Feb;61(1):41-6. doi: 10.1111/j.1574-695X.2010.00743.x. Epub 2010 Oct 19
- ²²⁰ Reichman O, Akins R, Sobel JD. **Boric acid addition to suppressive antimicrobial therapy for recurrent bacterial vaginosis.** *Sex Transm Dis.* 2009 Nov;36(11):732-4
- ²²¹ Kim TK, Thomas SM, Ho M, Sharma S, Reich CI, Frank JA et al. **Heterogeneity of vaginal microbial communities within individuals.** *J Clin Microbiol.* 2009 Apr;47(4):1181-9. Epub 2009 Jan 21
- ²²² El Aila NA, Tency I, Claeys G, Verstraelen H, Saerens B, Santiago GL et al. **Identification and genotyping of bacteria from paired vaginal and rectal samples from pregnant women indicates similarity between vaginal and rectal microflora.** *BMC Infect Dis.* 2009 Oct 14;9:167
- ²²³ Hensel KJ, Randis TM, Gelber SE, Ratner AJ. **Pregnancy-specific association of vitamin D deficiency and bacterial vaginosis.** *Am J Obstet Gynecol.* 2011 Jan;204(1):41.e1-9. Epub 2010 Oct 8
- ²²⁴ Mirmonsef P, Gilbert D, Zariffard MR, Hamaker BR, Kaur A, Landay AL et al. **The effects of commensal bacteria on innate immune responses in the female genital tract.** *Am J Reprod Immunol.* 2011 Mar;65(3):190-5. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00943.x. Epub 2010 Dec 9